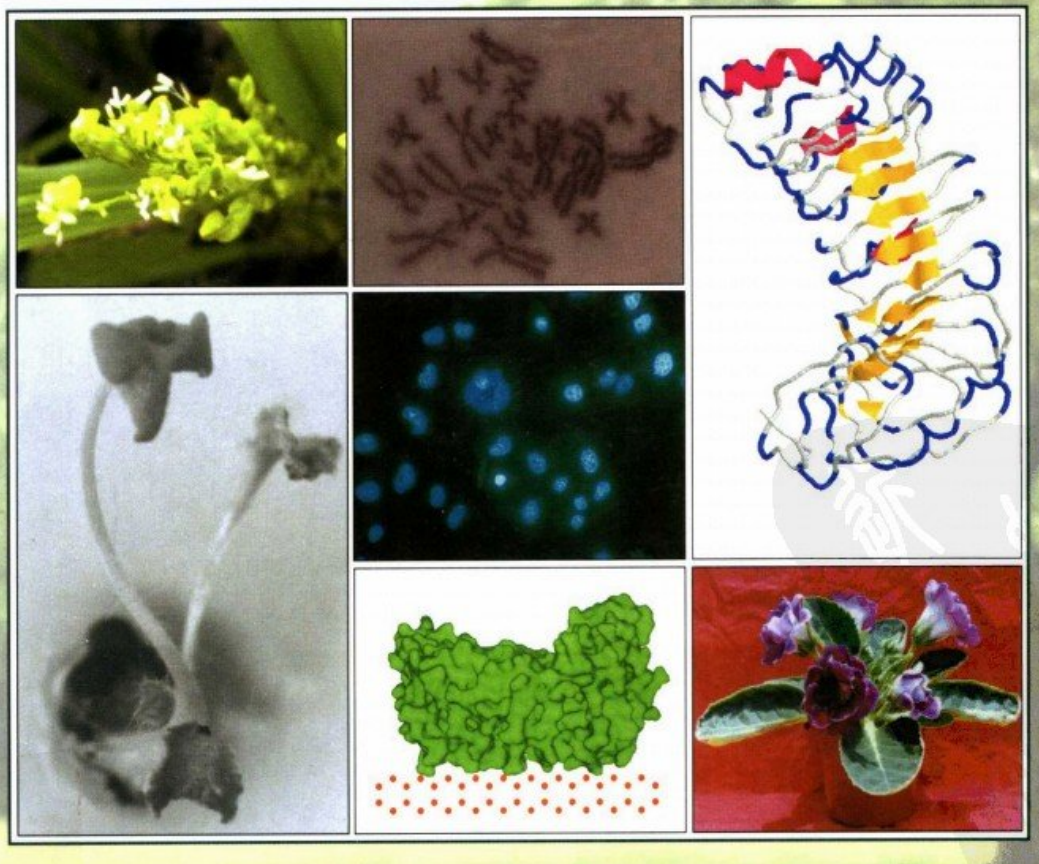
21世纪高等院校教材

国家理科基地教材

细胞生物学

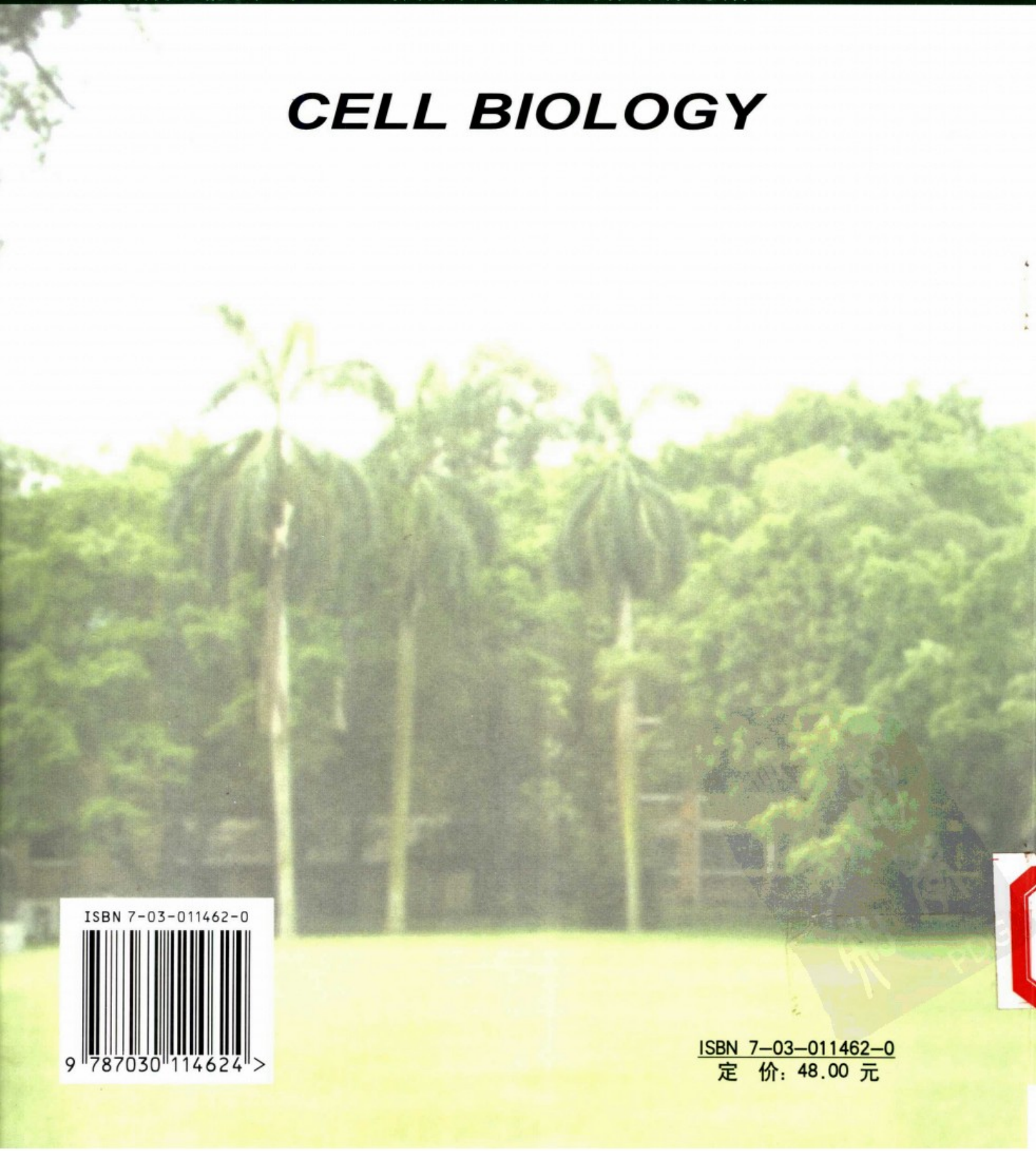
王金发 编著



科学出版社
www.sciencep.com

责任编辑：谢灵玲 刘 安　封面设计：陈 敬　责任印制：安春生

CELL BIOLOGY



ISBN 7-03-011462-0
9 787030 114624 >

ISBN 7-03-011462-0
定 价：48.00 元

W 231

21世纪高等院校教材·国家理科基地教材

细胞生物学

王金发　编著

科学出版社
北京

内 容 简 介

本书是中山大学王金发教授在十余年讲授细胞生物学课程的基础上编著而成。其显著特点是内容全面、重点突出，且语言生动、风格一致。结构设置富有特色，注重背景知识的介绍，激发学生兴趣，培养独立思维的能力。

全书共14章，包括细胞概述、细胞生物学研究方法、细胞质膜与跨膜运输、细胞环境与互作、细胞通讯、核糖体与核酶、线粒体与过氧化物酶体、叶绿体与光合作用、内膜系统与蛋白质分选和膜运输、细胞骨架与细胞运动、细胞核与染色体、细胞周期与细胞分裂、胚胎发育与细胞分化、细胞衰老、死亡与癌变等内容。

本书可作为综合性大学、医学、农学、林学相关专业本科生、研究生教材；同时可作为网络学院的细胞生物学课程的文字教材，也可供教师和有关科研、管理人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

细胞生物学/王金发编著. —北京：科学出版社，2003
(21世纪高等院校教材·国家理科基地教材)
ISBN 7-03-011462-0

Ⅰ. 细… Ⅱ. 王… Ⅲ. 细胞生物学-高等学校-教材 Ⅳ. Q2

中国版本图书馆CIP数据核字(2003)第040413号

责任编辑：谢灵玲 刘 安/责任校对：刘小梅
责任印制：安春生/封面设计：陈 敬

科学出版社 出版
北京东黄城根北街16号
邮政编码：100717
http://www.sciencep.com
源海印刷有限责任公司 印刷
科学出版社发行 各地新华书店经销
*
2003年8月第 一 版 开本：850×1168 1/16
2003年8月第一次印刷 印张：42 1/2
印数：1—4 000 字数：1 006 000

定价：48.00元

(如有印装质量问题，我社负责调换〈杨中〉)

作者简介

王金发，1973年毕业于安徽大学生物系并留校任教，1982年7月中山大学生物系遗传学专业研究生毕业，同时获得理学硕士学位。1989年11月至1993年1月作为访问学者在美国洛杉矶希望城分子免疫学系从事癌基因的分子生物学研究。现任中山大学生命科学学院副院长、教授、博士生导师、中共广东省委党校客座教授。

长期从事教学和科学研究工作，主讲的课程有细胞生物学、遗传学、基因工程原理、微生物遗传学、细胞科学与社会等，其中细胞生物学和基因工程原理是中山大学的优秀课程，细胞生物学被教育部批准为2002年度“国家理科基地创建名牌课程”，2003年细胞生物学被评为中山大学的精品课程。先后主持国家和广东省自然科学基金研究课题4项，参与1项国家863项目的研究工作；主持教育部教学研究项目2项、广东省教学研究项目2项。

在国内外刊物上发表科研和教学论文60余篇，主编著作1部，参编3部；主译1部，参译1部。

1991年获国家教委科技进步三等奖（第三完成人），1997年获广东省教学成果二等奖（第一完成人），2000年获广东省教学成果一等奖（第一完成人），2001年获国家级教学成果二等奖（第一完成人）。

2000年被评为宝钢教育基金优秀教师，2001年被评为广东省“南粤教书育人优秀教师”，同年被中山大学学生评为“中大学子心目中的良师”，2002年被评为中山大学师德十佳标兵。

作者的话

这本教材酝酿至今已有十个年头了，真所谓“十年磨一剑”。早在1993年接手细胞生物学课程的教学任务时就有心写一本《细胞生物学》教材，因自己功底浅，而且细胞生物学课程内容广泛，发展迅速，如是说：能教好就不错了，甭想著书。

经过六年的教学实践和积累，自己总算是入了一点门，也完成了初稿，可就是不敢与世人见面。教材是给学生用的，“丑媳妇总得见公婆”。本书稿第一次抛头露面是2000年秋，当时将她作为中山大学生命科学学院98级本科生细胞生物学课程试用教材，诚请同学们评说，心想，文章不怕“评”和“改”，总是越评越改越好，教材也是如此。

本书稿先后经1998、1999、2000级各专业正式试用了三届，每一届试用后都根据学生的建议进行了认真修改，甚至对某些章节进行了重写。先后有200多位同学写了书面建议，还有多位进修教师提出修改意见。因此，本书是教师和同学们共同劳动的结晶。

教科书不同于一般的著作，它要介绍科学原理，传授知识，应有两个显著的特点：科学性和先进性，三届同学在试用过程中对本教材的科学性和先进性给予了充分肯定，这才想到将该书稿出版。

正当此书稿在学生中试用时，我们以此书稿为脚本的《细胞生物学》网络课程申请得到教育部“新世纪网络课程建设工程”立项，在2002年4月中期检查及随后的对《细胞生物学》网络课程的质量认证中均得到学科专家和教育技术专家的好评，从而增强了将此书出版的信心。

本教材是国内近几年出版的同类教材中内容较多的一部。本想写简单一点，但在多年教学过程中体会到，内容还是丰富一些好，教师可以有选择性地讲授，留下部分内容让学生自学。如果内容太简单了，选择的余地就很小。在本书的14章内容中，我们通常选择讲授10章，另4章是在教师的指导下让学生自学，旨在培养学生自主学习的能力。

本教材在章节编排上进行了一些新的尝试，如从细胞社会学的观点，将细胞识别、细胞黏着、细胞连接、细胞外基质等并入“细胞环境与互作”一章，使学习者在学习细胞生物学时自然与人类社会相联系，以便加深对细胞生物学的理解。将核糖体与核酶作为一章，主要是出于核酶的发现源于对核糖体RNA加工的研究，合在一起不仅顺理成章，也有利于引导学生将细胞生物学的研究与分子生物学结合。以蛋白质分选为主线将内膜系统的内容融为一章，有利于以系统论的观点学习细胞生物学。另外将细胞通讯提前安排在第5章，不仅有利于激发学生学习的兴趣，也分散了课程的重点和难点章节。

在我们的教学过程中，要求学生必须完成的课程学习作业是写章节提要和编制章节试题。提要要求字数在2000～3000，试题必须包括5种以上题型并附参考答案，故本教材章的内容提要较简，只是给学习者指引一下；章后无思考题，学生可以自行编制，这样可以将被动思考转变为主动思考。多年的教学实践证明这两种做法对于培养学生的综合能力，掌握课程的核

心内容是行之有效的方法。

当今的大学教育,根本目的是培养创新人才。教师和学生都要有“以学生为主体,以教师为主导,培养素质和能力”这样的指导思想来完成一门课程的教与学。

我以为，教师讲授的应是一门课程，而不是一本书，任何教材都有它的局限性。我很赞成在教学过程中不要限定教材，但要有教学参考书。在授课中，教师不要限于一本教材，学生不必死啃一本教科书。教师在教学过程中，应博采众家之长，形成自己的风格和特色。

当一位好教师不容易，因为“好”的标准太高；编著一本好教材更难，因教材的影响面广，评头论足的多，容不得半点闪失。本书稿出版之际自我感觉尚可，只是有一点自信，但不敢说好。

著书者都是按自己的思维行事，当然是出于好心，我也是如此。由于本书是一人独立完成的，全书的编排和内容的取舍难免有所偏颇，尽管手稿经三届学生试用过，那只是自己的弟子们的意见，出版之后，敬请读者提出宝贵意见。

在此书即将出版之际，我要十分感谢我的妻子王玉珍女士。虽然她没有受过高等教育，但她对大学教师这个职业给予了充分的理解与支持，在我的业绩里有她的一半功劳。

在此书即将出版之际，我要感谢安徽大学。在那里，我开始了大学学习和其后大学教师工作的生涯。安徽大学有我的良师益友，是他们教育我如何献身教育事业。

中山大学是革命伟人创建的学校，“博学、审问、慎思、明辨、笃行”的校训催人奋进。我为有幸成为“中大人”而自豪，在这里我完成了研究生学业，并有了自己的事业。我愿继续努力，为将中山大学建设成世界一流的研究型综合性大学作出自己的贡献。

谨以此书献给中山大学 80 华诞。

王金发

2003 年春于广州康乐园

目　录

作者简介
作者的话
1　细胞概述 …… (1)
1.1　细胞的发现及细胞学说的创立 …… (1)
1.1.1　细胞的发现 …… (1)
1.1.2　细胞学说的创立 …… (2)
1.1.3　细胞学理论对细胞学发展的推动作用 …… (2)
1.1.4　细胞生物学发展简史 …… (3)
1.2　细胞的共性 …… (4)
1.2.1　细胞结构的共性 …… (4)
1.2.2　细胞功能的共性 …… (5)
1.2.3　细胞的形态 …… (5)
1.2.4　细胞的大小及体积的恒定 …… (6)
1.2.5　细胞及细胞器的计量单位 …… (7)
1.3　细胞的分子基础 …… (8)
1.3.1　细胞中的水 …… (8)
1.3.2　无机盐 …… (9)
1.3.3　有机小分子 …… (9)
1.3.4　生物分子及其功能 …… (12)
1.3.5　细胞结构体系的组装 …… (14)
1.4　细胞的类型和结构体系 …… (15)
1.4.1　原核细胞 …… (15)
1.4.2　真核细胞的两种主要类型：动物细胞和植物细胞 …… (17)
1.4.3　真核细胞的结构体系 …… (19)
1.4.4　真核细胞与原核细胞的比较 …… (19)
1.5　病毒——非细胞的生命体 …… (20)
1.5.1　病毒是比细胞更小的生命体 …… (20)
1.5.2　病毒只能在细胞中增殖 …… (21)
1.5.3　冠状病毒与 SARS …… (21)
1.6　细胞生命的进化 …… (23)
1.6.1　细胞生命的起源 …… (23)
1.6.2　真核细胞的起源 …… (24)

1.6.3 从单细胞向多细胞进化 …… (25)
1.7 我国细胞生物学的发展战略 …… (26)
1.7.1 细胞生物学的主要研究内容和发展方向 …… (26)
1.7.2 我国细胞生物学发展战略 …… (27)
提要 …… (28)
2 细胞生物学研究方法 …… (29)
2.1 显微成像技术 …… (29)
2.1.1 光学和电子显微镜成像原理 …… (30)
2.1.2 常用的光学显微镜 …… (34)
2.1.3 光学显微镜的样品制备 …… (37)
2.1.4 电子显微镜 …… (39)
2.1.5 电子显微镜的样品制备 …… (42)
2.1.6 间接成像技术 …… (44)
2.2 细胞化学技术 …… (47)
2.2.1 酶细胞化学技术 …… (47)
2.2.2 免疫细胞化学技术 …… (48)
2.2.3 其他细胞化学技术 …… (48)
2.3 细胞分选技术 …… (49)
2.3.1 流式细胞仪的基本结构 …… (49)
2.3.2 细胞分选 …… (49)
2.3.3 染色体分选 …… (50)
2.4 细胞工程技术 …… (51)
2.4.1 细胞培养 …… (51)
2.4.2 细胞融合与单克隆抗体技术 …… (54)
2.4.3 动物细胞核移植克隆技术 …… (56)
2.5 分离技术 …… (57)
2.5.1 离心分离技术 …… (57)
2.5.2 层析分离技术 …… (59)
2.6 分子生物学方法 …… (61)
2.6.1 基因工程技术 …… (61)
2.6.2 基因作图与人类基因组计划 …… (62)
2.6.3 PCR 技术 …… (63)
2.6.4 选择性基因剔除与转基因鼠 …… (64)
2.6.5 乳腺生物反应器技术 …… (67)
提要 …… (69)
3 细胞质膜与跨膜运输 …… (70)
3.1 概述 …… (70)
3.1.1 细胞的膜结构 …… (70)

3.1.2 细胞膜的功能 …… (70)
3.2 红细胞膜结构 …… (72)
3.2.1 红细胞的生物学 …… (72)
3.2.2 红细胞膜结构的研究 …… (73)
3.2.3 红细胞质膜 …… (75)
3.3 膜的化学组成 …… (77)
3.3.1 膜脂 …… (78)
3.3.2 膜糖 …… (82)
3.3.3 膜蛋白 …… (85)
3.4 膜的分子结构及特点 …… (89)
3.4.1 结构模型 …… (89)
3.4.2 膜不对称性 …… (93)
3.4.3 膜的流动性 …… (96)
3.5 物质的跨膜运输 …… (102)
3.5.1 质膜物质运输概述 …… (102)
3.5.2 被动运输 …… (106)
3.5.3 主动运输 …… (113)
3.5.4 主动与被动运输、动物与植物主动运输的比较 …… (122)
提要 …… (123)
4 细胞环境与互作 …… (124)
4.1 细胞表面 …… (124)
4.1.1 细胞被 …… (124)
4.1.2 植物的细胞外结构：细胞壁 …… (126)
4.1.3 细菌的细胞细胞壁 …… (130)
4.2 细胞外基质 …… (132)
4.2.1 细胞外基质的基本组成和功能 …… (132)
4.2.2 蛋白聚糖与透明质酸 …… (134)
4.2.3 胶原和弹性蛋白 …… (136)
4.2.4 细胞外基质中的黏着蛋白 …… (142)
4.2.5 细胞外基质与细胞的相互关系 …… (144)
4.3 细胞识别与黏着 …… (148)
4.3.1 细胞识别及识别反应 …… (149)
4.3.2 细胞黏着的机制 …… (152)
4.4 细胞连接 …… (156)
4.4.1 细胞连接的概念和类型 …… (156)
4.4.2 紧密连接 …… (157)
4.4.3 斑块连接 …… (158)
4.4.4 通讯连接 …… (163)

提要 …… (166)
5 细胞通讯 …… (167)
5.1 细胞通讯的基本特点 …… (167)
5.1.1 细胞通讯的方式 …… (168)
5.1.2 信号分子及信号传导 …… (169)
5.1.3 受体与信号的接收 …… (172)
5.1.4 受体与配体相互作用及研究方法 …… (179)
5.1.5 信号转导与第二信使 …… (182)
5.2 G蛋白偶联受体及信号转导 …… (186)
5.2.1 G蛋白的结构与功能 …… (186)
5.2.2 PKA系统的信号转导机制 …… (188)
5.2.3 PKC系统的信号转导机制 …… (197)
5.3 酶联受体信号转导 …… (208)
5.3.1 鸟苷酸环化酶受体与第二信使cGMP …… (208)
5.3.2 受体酪氨酸激酶/Ras途径 …… (210)
5.4 其他信号转导途径 …… (218)
5.4.1 NO的细胞信使作用 …… (219)
5.4.2 整联蛋白介导的信号转导 …… (220)
5.5 信号的整合与终止 …… (222)
5.5.1 信号的趋同、趋异与窜扰 …… (222)
5.5.2 信号终止 …… (225)
提要 …… (227)
6 核糖体与核酶 …… (229)
6.1 核糖体的形态结构 …… (229)
6.1.1 核糖体的类型和化学组成 …… (229)
6.1.2 核糖体蛋白质与rRNA …… (231)
6.1.3 细菌核糖体的结构模型 …… (232)
6.2 核糖体的生物发生 …… (233)
6.2.1 核糖体rRNA基因的转录与加工 …… (233)
6.2.2 核糖体的装配 …… (237)
6.3 核糖体的功能——蛋白质的合成 …… (239)
6.3.1 核糖体的功能位点 …… (239)
6.3.2 蛋白质合成的基本过程 …… (240)
6.3.3 多聚核糖体 …… (245)
6.3.4 蛋白质合成抑制剂 …… (246)
6.3.5 细胞中蛋白质的寿命与降解 …… (248)
6.4 反义RNA与核酶 …… (250)
6.4.1 小分子RNA与反义RNA …… (250)

6.4.2 核酶 …… (253)
6.4.3 内含子的切除：核酶的作用机制 …… (255)
6.4.4 RNA 编辑 …… (258)
提要 …… (260)
7 线粒体与过氧化物酶体 …… (261)
7.1 线粒体的形态结构 …… (261)
7.1.1 线粒体的发现与功能研究 …… (262)
7.1.2 线粒体的形态与分布 …… (262)
7.2 线粒体的结构与化学组成 …… (264)
7.2.1 线粒体的结构 …… (264)
7.2.2 线粒体膜的通透性 …… (264)
7.2.3 线粒体各部分的化学组成和特性 …… (265)
7.2.4 线粒体内膜的主动运输系统 …… (267)
7.3 导向信号与线粒体蛋白定位 …… (269)
7.3.1 蛋白质寻靶与分选 …… (269)
7.3.2 线粒体蛋白转运 …… (271)
7.3.3 线粒体蛋白转运的实验研究 …… (274)
7.4 线粒体的功能——氧化磷酸化作用 …… (276)
7.4.1 真核细胞中的氧化作用 …… (276)
7.4.2 呼吸链与电子传递 …… (281)
7.4.3 氧化磷酸化：ATP 形成机制 …… (288)
7.5 线粒体的遗传、增殖和起源 …… (294)
7.5.1 线粒体遗传 …… (294)
7.5.2 线粒体的增殖与起源 …… (297)
7.6 过氧化物酶体 …… (299)
7.6.1 过氧化物酶体的发现及所含酶类 …… (300)
7.6.2 过氧化物酶体的功能 …… (301)
7.6.3 过氧化物酶体的生物发生 …… (302)
提要 …… (303)
8 叶绿体与光合作用 …… (304)
8.1 叶绿体的来源与分布 …… (304)
8.1.1 叶绿体与质体 …… (304)
8.1.2 叶绿体的形态大小、数量和分布 …… (306)
8.2 叶绿体的结构与化学组成 …… (306)
8.2.1 叶绿体被膜的结构及特性 …… (307)
8.2.2 类囊体 …… (309)
8.2.3 叶绿体蛋白的定位 …… (311)
8.2.4 叶绿体组分的分离 …… (312)

8.3 光合作用的光反应 …… (314)
8.3.1 光合作用概述 …… (314)
8.3.2 光吸收 …… (315)
8.3.3 电子传递 …… (319)
8.3.4 光合磷酸化 …… (325)
8.4 光合作用的暗反应 …… (328)
8.4.1 C_3 途径：卡尔文循环 …… (328)
8.4.2 光呼吸和 C_4 植物 …… (330)
8.5 叶绿体遗传 …… (333)
8.5.1 叶绿体遗传 …… (333)
8.5.2 叶绿体的发生和起源 …… (335)
8.5.3 叶绿体与线粒体结构与功能的比较 …… (335)
提要 …… (337)
9 内膜系统与蛋白质分选和膜运输 …… (339)
9.1 细胞质膜系统及其研究方法 …… (339)
9.1.1 膜结合细胞器与内膜系统 …… (339)
9.1.2 内膜系统与蛋白质分选 …… (343)
9.1.3 内膜系统的研究方法 …… (347)
9.2 内质网 …… (348)
9.2.1 形态结构和化学组成 …… (349)
9.2.2 光面内质网的功能 …… (351)
9.2.3 糙面内质网的功能——蛋白质转运 …… (355)
9.3 高尔基体 …… (365)
9.3.1 高尔基体的形态结构和极性 …… (366)
9.3.2 高尔基体的功能 …… (368)
9.4 溶酶体 …… (373)
9.4.1 溶酶体的形态结构 …… (373)
9.4.2 溶酶体的发现与溶酶体的酶类 …… (374)
9.4.3 溶酶体的类型 …… (377)
9.4.4 溶酶体的功能 …… (377)
9.4.5 溶酶体的生物发生 …… (380)
9.5 细胞的分泌与内吞作用 …… (387)
9.5.1 细胞分泌 …… (387)
9.5.2 吞噬作用与内吞作用 …… (391)
9.6 小泡运输的分子机制 …… (397)
9.6.1 运输小泡的类型和分选信号 …… (398)
9.6.2 披网格蛋白小泡形成的机制 …… (400)
9.6.3 COP 被膜小泡形成的机制 …… (402)

9.6.4 小泡的定向运输、停靠和融合机制 …… (404)
9.6.5 膜的生物发生 …… (407)
提要 …… (409)
10 细胞骨架与细胞运动 …… (411)
10.1 细胞骨架的组成和功能 …… (411)
10.1.1 细胞骨架的组成和分布 …… (412)
10.1.2 细胞骨架的功能 …… (412)
10.1.3 细胞骨架的研究方法 …… (413)
10.2 微管 …… (415)
10.2.1 微管的结构和类型 …… (415)
10.2.2 微管装配的动力学 …… (416)
10.2.3 微管结合蛋白 …… (423)
10.2.4 分子发动机 …… (425)
10.2.5 微管的功能 …… (427)
10.3 微丝 …… (432)
10.3.1 微丝的形态和组成 …… (432)
10.3.2 微丝装配的动力学 …… (434)
10.3.3 微丝结合蛋白 …… (437)
10.3.4 肌细胞：特化的肌收缩功能 …… (443)
10.3.5 肌动蛋白和肌球蛋白在非肌细胞中的作用 …… (449)
10.4 中间纤维 …… (454)
10.4.1 中间纤维的结构与类型 …… (454)
10.4.2 中间纤维的组装及去组装 …… (456)
10.4.3 中间纤维的功能 …… (457)
10.4.4 三种细胞骨架的比较 …… (459)
提要 …… (460)
11 细胞核与染色体 …… (461)
11.1 核被膜 …… (462)
11.1.1 核被膜的结构 …… (462)
11.1.2 核孔复合物 …… (463)
11.1.3 核被膜的功能 …… (463)
11.2 核孔复合体的运输作用 …… (464)
11.2.1 核孔运输的一般特点 …… (464)
11.2.2 核孔运输的信号引导 …… (465)
11.2.3 核蛋白、核定位信号、输入蛋白、输出蛋白 …… (466)
11.2.4 核运输系统 …… (467)
11.3 分子伴侣 …… (471)
11.3.1 分子伴侣的发现及种类 …… (471)

11.3.2 分子伴侣的功能和作用机制 …… (474)
11.4 染色质 …… (477)
11.4.1 染色质 DNA …… (477)
11.4.2 组蛋白 …… (481)
11.4.3 非组蛋白 …… (483)
11.4.4 异染色质和常染色质 …… (486)
11.4.5 染色质的基本结构——核小体 …… (488)
11.5 染色体 …… (492)
11.5.1 染色体的包装 …… (492)
11.5.2 中期染色体结构 …… (495)
11.5.3 核型与染色体分带 …… (497)
11.5.4 巨型染色体 …… (499)
11.6 核仁 …… (501)
11.6.1 核仁的结构与核仁周期 …… (501)
11.6.2 核仁的功能 …… (502)
11.7 核基质 …… (503)
11.7.1 核基质的化学组成 …… (503)
11.7.2 核基质的功能 …… (504)
提要 …… (507)
12 细胞周期与细胞分裂 …… (508)
12.1 细胞周期 …… (508)
12.1.1 细胞周期时相及类型 …… (508)
12.1.2 细胞周期各时相的合成活动 …… (510)
12.1.3 细胞周期中细胞形态结构的变化 …… (511)
12.1.4 细胞周期的研究方法 …… (512)
12.2 细胞周期调控 …… (513)
12.2.1 细胞周期调控概述 …… (513)
12.2.2 蛋白激酶在细胞周期调控中的作用 …… (514)
12.2.3 裂殖酵母的细胞周期调控 …… (521)
12.2.4 芽殖酵母的细胞周期调控 …… (523)
12.2.5 哺乳动物细胞周期的控制 …… (525)
12.2.6 细胞周期的关卡 …… (527)
12.2.7 MPF 的作用机制 …… (529)
12.3 有丝分裂 …… (531)
12.3.1 有丝分裂过程 …… (531)
12.3.2 有丝分裂的机制 …… (534)
12.4 减数分裂 …… (538)
12.4.1 减数分裂的一般特点 …… (539)

12.4.2 减数分裂的主要类型 …… (539)
12.4.3 第一次减数分裂 …… (540)
12.4.4 第二次减数分裂 …… (543)
12.4.5 减数分裂过程中的遗传重组及其机制 …… (544)
12.4.6 减数分裂的生物学意义 …… (547)
提要 …… (549)
13 胚胎发育与细胞分化 …… (550)
13.1 配子发生与受精作用 …… (551)
13.1.1 配子发生 …… (551)
13.1.2 受精作用 …… (555)
13.2 胚胎形成与分化 …… (559)
13.2.1 胚胎形成 …… (559)
13.2.2 细胞分化、细胞决定与形态发生 …… (561)
13.2.3 影响分化和形态发生的其他因素 …… (565)
13.2.4 细胞分化中的核质关系 …… (565)
13.2.5 转决定、脱分化与再生 …… (566)
13.3 细胞分化的分子基础 …… (568)
13.3.1 分化细胞的基因表达 …… (568)
13.3.2 真核生物基因表达的调控 …… (569)
13.3.3 果蝇发育的调控 …… (578)
13.4 干细胞 …… (585)
13.4.1 干细胞分类和特点 …… (585)
13.4.2 胚胎干细胞 …… (586)
13.4.3 成体干细胞 …… (588)
提要 …… (589)
14 细胞衰老、死亡与癌变 …… (591)
14.1 细胞衰老 …… (591)
14.1.1 衰老的概念 …… (591)
14.1.2 细胞的寿限 …… (592)
14.1.3 细胞衰老的特征 …… (594)
14.1.4 细胞衰老的理论 …… (595)
14.2 细胞死亡 …… (600)
14.2.1 多细胞有机体中细胞数量和质量的控制 …… (600)
14.2.2 程序性细胞死亡及其特性 …… (602)
14.2.3 程序性细胞死亡的机理 …… (605)
14.2.4 程序性细胞死亡的生物学意义 …… (610)
14.3 癌细胞 …… (611)
14.3.1 癌生物学 …… (611)

14.3.2 癌的起因：物理和化学致癌物 …… (614)
14.3.3 肿瘤发生遗传学 …… (616)
提要 …… (625)
参考文献 …… (627)
缩写表 …… (631)
中文索引 …… (637)
英文索引 …… (647)
后记 …… (662)

1 细胞概述

所有生物都是由细胞（cell）构成的。细胞是由膜包围着含有细胞核（或拟核）的原生质所组成，是生物体结构和功能的基本单位，也是生命活动的基本单位。细胞能够通过分裂而增殖，这是生物体个体发育和系统发育的基础。除了病毒、类病毒等是非细胞的生命体以外，其他生命有机体的结构和功能单位都是细胞。细菌、酵母等微生物是以单细胞形式存在，而高等动、植物则是由多细胞构成的，如人大约有 3×10^{13} 个细胞，这些细胞组成不同组织和器官。

研究细胞及其生物学功能的科学称为细胞生物学（cell biology）。它是以细胞为研究对象，从细胞的整体水平、亚显微水平、分子水平三个层次，以动态的观点研究细胞和细胞器结构和功能、细胞生活史和各种生命活动规律的学科。细胞生物学是现代生命科学前沿分支学科之一，主要是从细胞不同结构层次来研究细胞生命活动的基本规律。从生命结构层次看，细胞生物学介于分子生物学与发育生物学之间，与它们相互衔接，互相渗透。

1.1 细胞的发现及细胞学说的创立

第一个发现细胞的是英国学者胡克（Robert Hooke），相隔 170 多年后，德国植物学家施莱登（Mathias Schleiden）和动物学家施旺（Theodor Schwann）创立了细胞学说。

1.1.1 细胞的发现

绝大多数细胞是无法用肉眼观察的，所以在显微镜发明之前，人们不知道细胞的存在。细胞的发现得益于光学显微镜的研制和发展。第一台显微镜是荷兰眼镜商 Janssen 在 1604 年发明的，虽然倍数不高（只能观察小昆虫），也并非用它发现了细胞，但它却有着重要的科学意义。1665 年，英国物理学家和数学家胡克发表了《显微图谱》（*Micrographia*）一书，描述了用他自己设计并制造的显微镜观察栎树软木塞切片时发现其中有许多小室，状如蜂窝，称为“cella”，而他当时的目的只是想弄清楚为什么软木塞吸水后能够膨胀，并且能够堵塞住瓶中的气体溢出。这是人类

图 1-1 胡克所用的显微镜及观察的栎树细胞的细胞壁（引自 Karp，1996）

第一次发现细胞，不过，胡克发现的只是死细胞的细胞壁（图 1-1）。另外，胡克所制造的显微镜放大倍数只有 30 倍，这就限制了他进一步发现活细胞及细胞的内部结构。胡克的发现对细胞学的建立和发展具有开创性的意义，其后，生物学家就用“cell”一词来描述生物体的基本结构。

1674 年，荷兰布商列文虎克（Anton van Leeuwenhoek）为了检查布的质量，亲自磨制透镜，装配了高倍显微镜（300 倍左右），并观察到了血细胞、池塘水滴中的原生动物、人类和哺乳类动物的精子，这是人类第一次观察到完整的活细胞。列文虎克把他的观察结果写信报告给英国皇家学会，得到学会的充分肯定，并很快成为世界知名人士。

1.1.2 细胞学说的创立

列文虎克研制的显微镜放大倍数虽然有 300 倍，但分辨率只有 1.4μm，并且清晰度不强，所以仍不能很好地观察细胞内部的细微结构，限制了人们对细胞进一步的认识。在发现细胞后的 170 多年里，人们用光学显微镜陆续发现了一些不同类型的细胞，但对细胞的生物学意义仍然不清楚。直到 19 世纪 30 年代，显微镜的制造技术得到较大改进，分辨率达到 1μm，人们才开始揭示细胞的生物学意义。

1838 年，德国植物学家施莱登根据他的研究结果得出了这样一个结论：尽管植物的不同组织在结构上有着很大的差异，但是植物是由细胞构成的，植物的胚是由单个细胞产生的。

1839 年，德国动物学家施旺发表了关于动物生命的细胞基础的综合性报告，指出动物和植物的细胞具有类似的结构，并提出了细胞学说（cell theory）的两条最重要的基本原理：第一，地球上的生物都是由细胞构成的；第二，所有的生活细胞在结构上都是类似的。至于细胞学说的第三个重要的基本原理是 1858 年德国医生和病理学家魏尔肖（Theodor Virchow）补充的：所有的细胞都是来自于已有细胞的分裂，即细胞来自于细胞。

细胞学说的创立大大推进了人类对生命自然界的认识，有力地促进了生命科学的进步。细胞学说的提出论证了生物界的统一性和生命的共同起源。恩格斯对细胞学说给予极高的评价，把它与进化论和能量守恒定律并列称为 19 世纪的三大发现。

1.1.3 细胞学理论对细胞学发展的推动作用

细胞科学是实验科学，而实验科学的发展既依赖于实验观察，又有待于理论的升华。尽管细胞是 1665 年发现的，但在其后的 170 年的时间里细胞学的研究没有什么大的发展，究其原因主要是没有将这一发现上升为理论，因而也就没有指导作用。细胞学说创立之后，在这一理论的指导下，细胞学得到了突飞猛进的发展。

19 世纪的最后 25 年，即 1875～1900 年，是细胞学的经典时期。这个时期在细胞学说的推动下，应用固定和染色技术，在光学显微镜下观察细胞的形态结构和细胞的分裂活动，取得了极为丰硕的成果，代表性的成就有如下几点。

原生质理论的提出　1840 年 Pukinje 在动物、1846 年 von Mohl 在植物中分别看到了“肉样质”的物质，并将其命名为“原生质”（protoplasm）。1861 年 Schultze 认为动植物细胞

中的原生质具有同样的意义，并提出了原生质理论：有机体的组织单位是一小团原生质，这种物质在一般有机体中是相似的，并把细胞明确地定义为："细胞是具有细胞核和细胞膜的活物质"。1880 年 Hanstain 提出"原生质体"（protoplast）概念，把细胞概念演变成由细胞膜包围着的原生质，原生质分化为细胞核和细胞质。

细胞受精和分裂的研究　1875 年 Hertwig 发现受精卵中两亲本核的合并；1877 年 Strasburger 发现动物的受精现象；1883 年 van Beneden 在动物、1886 年 Strasburger 在植物分别发现了减数分裂现象；1880～1882 年 Flemming 在蝾螈幼虫的组织细胞中发现了有丝分裂。

一些重要细胞器的发现　1883 年 van Beneden 和 Boveri 在动物细胞中发现了中心体；1888 年 Waldeyer 提出染色体概念；1898 年 Golgi 发现了高尔基体；同年，线粒体也被正式命名。

在这短短的25年里，取得如此多的成果，除了细胞学说本身的贡献外，技术革新起着重要的作用。细胞染色技术、切片技术、显微技术等的不断改进和创新保证了科学研究的进步。当然，更重要的是这一时期人才辈出，他们不断追求和探索的精神才是细胞学得以发展的原动力。

1.1.4　细胞生物学发展简史

对细胞生物学的发展阶段划分不一，本书分为 4 个时期：

(1) *细胞的发现及细胞学说的创立*　这一时期跨度较大，从 1665 年到 1874 年。

(2) *细胞学的经典时期*　即我们上面讨论的从 1875 年到 1900 年的 25 年。

(3) *实验细胞学时期*　从 1900 年到 1953 年的半个世纪里，细胞学的发展主要是采用实验的手段研究细胞学的问题，将这一时期称为实验细胞学（experimental cytology）时期，其特点是从形态结构的观察深入到生理功能、生物化学、遗传发育机制的研究。由于实验研究不断同相邻学科结合、渗透，导致了一些重要分支学科的建立和发展：

细胞遗传学（cytogenetics）。遗传学和细胞学结合建立了细胞遗传学，主要是从细胞学的角度，特别是从染色体的结构和功能以及染色体和其他细胞器的关系来研究遗传现象，阐明遗传和变异的机制。

细胞生理学（cytophysiology）。细胞学同生理学结合建立了细胞生理学，主要研究内容包括细胞从周围环境中摄取营养的能力、代谢功能、能量的获取、生长、发育与繁殖机制以及细胞受环境的影响而产生适应性和运动性的活动。细胞的离体培养技术对细胞生理学的研究具有巨大贡献。

细胞化学（cytochemistry）。细胞学和化学的结合产生了细胞化学，主要是研究细胞结构的化学组成及化学分子的定位、分布及其生理功能。如 1943 年 Claude 用高速离心法从细胞匀浆液中分离线粒体，然后研究它的化学组成和生理功能并得出结论：线粒体是细胞氧化中心。1924 年 Feulgen 发明的 DNA 特殊染色方法——Feulgen 反应开创了 DNA 的定性和定量分析。此后发展了一系列进行细胞内 RNA 和蛋白质定量分析的方法，对细胞的核酸和蛋白质代谢活动研究起了极大的促进作用。

(4) *细胞生物学的诞生*　1953 年 Watson 和 Crick 提出 DNA 双螺旋结构模型，标志着分子生物学（molecular biology）的诞生。到底是何时产生了细胞生物学，没有肯定的答案，

一般的看法是1965年，Derobetis将其编著的《普通细胞学》改为《细胞生物学》，标志着细胞生物学的诞生。由于不断将分子生物学的研究成果和方法引进细胞学，使细胞学的知识得到了极大的更新。此后，细胞生物学和分子生物学之间相互渗透，相得益彰。

20世纪80年代开始出现的分子细胞生物学（molecular cell biology），是细胞生物学的主要发展方向。

1.2 细胞的共性

虽然细胞学说是根据光学显微镜对不同类型的细胞进行形态观察得出的结论，但是它们在结构和功能上的相似性甚至超过形态上的相似性。

1.2.1 细胞结构的共性

不同类型的细胞在结构上具有极大的相似性。

1.2.1.1 细胞都具有选择透性的膜结构

细胞都具有一层界膜，将细胞内的环境与外环境隔开。为了能够调节物质进出细胞，并使细胞有最适合的内部环境，膜结构有两个基本的作用：一是在细胞内外起屏障作用，即不允许物质随意进出细胞；二是要在细胞内构筑区室，形成各个功能特区。

被质膜包裹在细胞内的所有生活物质称为原生质，包括细胞核和细胞质。细胞质(cytoplasm)是指细胞内除核以外的原生质，包括透明的黏液状的胞质溶胶及悬浮于其中的细胞器。

植物细胞与动物细胞的一个重要差别是在植物细胞质膜的外面还有一层细胞结构，即细胞壁。在离体条件下细胞壁很容易被酶水解掉，脱去细胞壁的细胞就称为原生质体，所以原生质体是一个工程学的概念。如植物细胞和细菌（或其他有细胞壁的细胞）通过酶使细胞壁溶解，得到的是具有质膜的原生质体。动物细胞不具有细胞壁，其本身就相当于原生质体。

1.2.1.2 细胞都具有遗传物质

细胞内最重要的物质就是遗传物质DNA。在真核细胞中，DNA被包裹在膜结构即细胞核中，而原核细胞的DNA是裸露的，没有核膜包裹，所以称为拟核（nucleoid）。DNA是遗传信息的一级载体，能够被转录成RNA，并进行蛋白质的合成，这就是遗传信息流。

现有的研究表明，在生命的进化过程中，最早的遗传物质不是DNA而是RNA，也就是说先出现RNA，后逐渐进化形成DNA。

由于DNA储存遗传信息较RNA稳定，复制更精确，并且易于修复，所以它取代RNA成为遗传信息的主要载体。为了保证遗传信息的准确传递，RNA被保留下来，专司遗传信息的转录和指导蛋白质的合成。少数原始生命形式的病毒，仍然保留RNA作为遗传信息的载体。

1.2.1.3 细胞都具有核糖体

所有类型的细胞，包括最简单的支原体都含有核糖体。真核细胞和原核细胞的核糖体不

仅功能相同，在结构上也十分相似，都是由大小两个亚基组成的，只不过原核细胞的核糖体比真核细胞的核糖体稍小一些。核糖体是蛋白质合成的机器，在细胞遗传信息流的传递中起重要作用。

1.2.2 细胞功能的共性

无论何种来源的细胞，都具有基本相似的功能。

细胞能够进行自我增殖和遗传 细胞能够以一分为二的分裂方式进行增殖，动植物细胞、细菌细胞都是如此。为了保证新产生的子细胞具有与亲代相似的遗传性，细胞在分裂前遗传物质要成功进行复制，并在分裂时均等分配给每个子细胞。在多数情况下，分裂而成的两个子细胞在体积上大致相等。在某些情况下，如人的卵母细胞在分裂时，其中有一个子细胞不仅得到一套遗传物质，而且还会得到几乎全部的细胞质，另一个细胞仅仅得到遗传物质。此外，细胞都能利用遗传信息指导细胞物质的合成。

细胞都能进行新陈代谢 新陈代谢是细胞的基本活动，包括物质代谢和能量代谢。细胞内有机分子的合成和分解反应都是由酶催化的，即细胞的代谢作用是由酶控制的。

细胞都具有运动性 所有细胞都具有一定的运动性，包括细胞自身的运动和细胞内的物质运动。如植物细胞的中央液泡会影响细胞内物质的均匀分布，但可以通过胞质环流使细胞内的物质均匀分布。

1.2.3 细胞的形态

细胞具有多种多样的形态（图 1-2），有球形、杆状、星形、多角形、梭形、圆柱形等。多细胞生物体，依照细胞在各种组织和器官中所承担的不同功能，分化形成了各种不同的形状。这些不同的形状一方面取决于对功能的适应，另一方面亦受细胞的表面张力、胞质的黏滞性、细胞膜的坚韧程度以及微管和微丝骨架等因素的影响。

细胞形态结构与功能的相关性与一致性是很多细胞的共同特点。如红细胞呈扁圆形的结构，有利于 O_2 和 CO_2 的交换；高等动物的卵细胞和精细胞不仅在形态、而且在大小方面都是截然不同的，这种不同与它们各自的功能相适应。卵细胞之所以既大又圆，是因为卵细胞受精之后，要为受精卵提供早期发育所需的信息和相应的物质，这样，卵细胞除了带有一套完整的基因组外，还有很多预先合成的 mRNA 和蛋白质，所以体积就大；而圆形的表面则便于与精细胞结合。精细胞的形

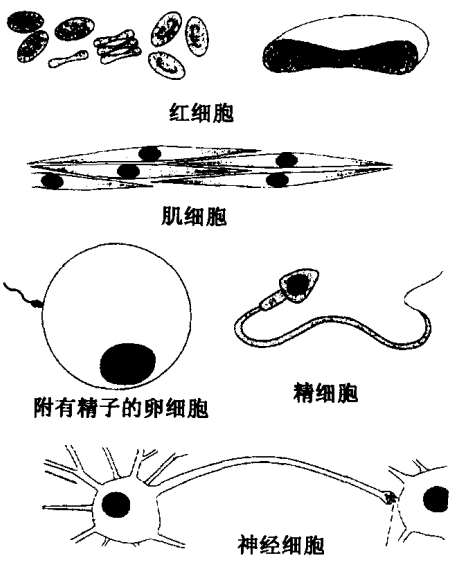


图 1-2 不同的细胞形态
（改自 Alberts *et al*., 1994）

态是既细又长，这也是与它的功能相适应的。精细胞对后代的责任仅是提供一套基因组，所以它显得很轻装；至于精细胞的细尾巴则是为了运动寻靶，尖尖的头部，是为了更容易将它携带的遗传物质注入卵细胞。

1.2.4 细胞的大小及体积的恒定

细胞最为典型的特点是在一个极小的体积中形成极为复杂而又高度组织化的结构。典型的原核细胞的直径平均大小在 1～10μm 之间，而真核细胞的直径平均为 3～30μm，一般为 10～20μm（图 1-3）。

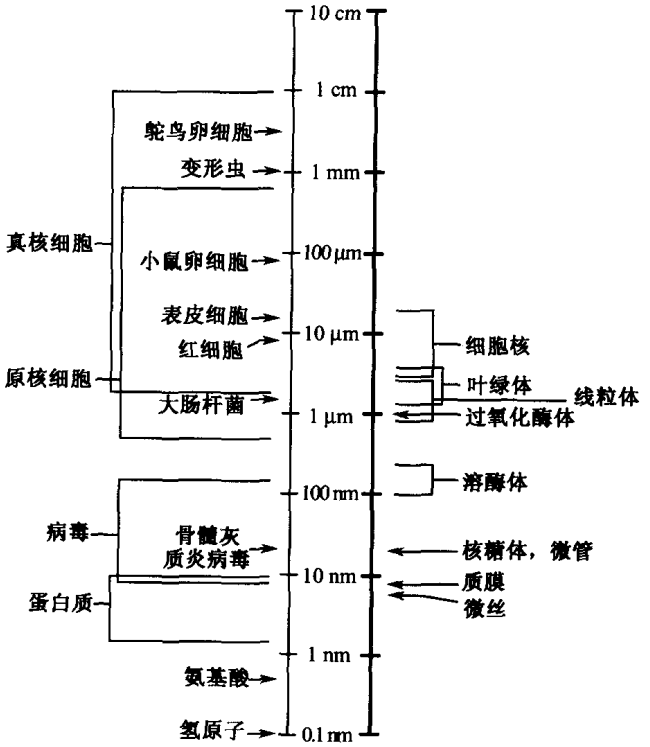


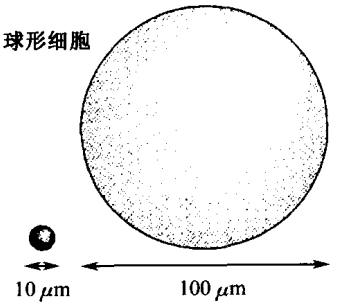
图1-3 典型的原核细胞、真核细胞、细胞器、病毒和分子的大小(引自 Kleinsmith *et al.*, 1995)

某些不同来源的同类细胞的大小变化很大，如人的卵细胞的直径只有 0.1mm，而鸵鸟的卵细胞的直径则有 0.5cm。但是，来自不同物种的多数同类型细胞的体积一般是相近的，不依生物个体的大小而增大或缩小。如人、牛、马、鼠、象的肾细胞、肝细胞的大小基本相同。因此，器官的大小主要决定于细胞的数量，与细胞的数量成正比，而与细胞的大小无关。

细胞本身的大小并非是随意改变的，细胞体积要维持相对恒定。哺乳动物细胞的体积大小受几个因素的限制，其中一个主要限制因素是体积与表面积的关系。以球形细胞为例（身体内的细胞并非都是球形）计算体积与表面积的关系（图 1-4），结果表明，球形细胞增大，其体积的增加要比表面积的增加大得多。这样，当细胞增大到一定程度时，质膜的表面积就不适应细胞进行内外物质的交换，细胞为了维持一个最佳的生存条件，必需维持最佳的表面

积，从而限制了体积的无限增大。

另一个限制细胞体积的因素是细胞内关键分子的浓度。一些重要的分子在细胞内的拷贝数是很少的，当细胞体积增大时，这些分子的浓度就越来越稀，一些重要的生化反应需要一定的分子浓度才能进行，所以细胞内分子浓度就成了限制细胞体积无限增大的另一个因素。真核细胞的体积一般是原核细胞的 1000 倍，真核细胞为了解决细胞内重要分子的浓度问题，出现了特化的内膜系统，使一些反应局限于特定的膜结合的细胞器内，这样，一些重要反应的分子浓度并没有被稀释。



半径	5 μm	50 μm
表面积 $(4\pi r^2)$	314 μm^2	31 400 μm^2
体积 $(4/3\pi r^3)$	524 μm^3	524 000 μm^3
$\frac{表面积}{体积}$	0.6	0.06

图 1-4　细胞体积与表面积间的关系
（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

细胞不仅对其体积的增大有限制，而且对体积减小也有限制。据研究，一个生活细胞要维持正常的独立生活功能，最低限度需要 500～1000 种不同类型的酶和蛋白质，这是目前在支原体（mycoplasma）中所发现的酶和蛋白质的量。而支原体是目前所知最小的原核细胞，它的体积只有 0.2～0.3μm^3，仍能完全独立地生存。很显然，细胞体积的最小化受制于维持细胞生命活动所需的酶和蛋白质种类的最低量。

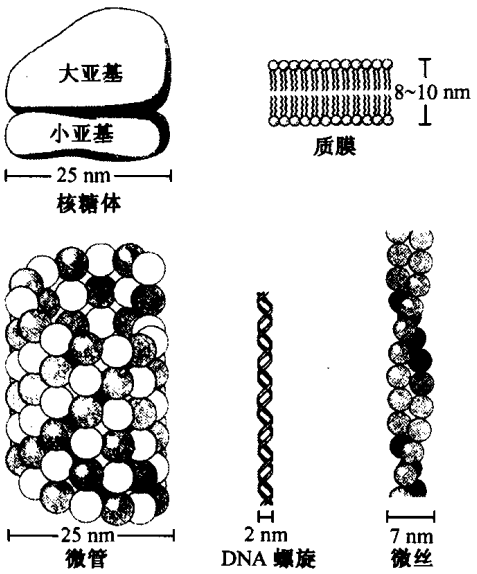


图 1-5　几种细胞结构的大小
（引自 Becker *et al*., 1996）

1.2.5　细胞及细胞器的计量单位

有两种计量细胞大小的单位，微米（μm）和纳米（nm）。1μm 等于 10^{-6}m，1nm 等于 10^{-9}m。使用电子显微镜后又提出埃（angstrom，Å）为超显微结构的计量单位，1 埃（Å）等于 0.1nm，但并不常用。1Å 可粗略地看成是一个氢原子的直径。较大的细胞器通常用 μm 表示，如细胞核的直径大约是 5～10μm，而线粒体的长度大约是 2μm。DNA 的宽度为 2 nm（图 1-5）。由于细胞的主要结构和分子的大小都在纳米之间，所以有人提出了“纳米生物学”，现在“纳米科学”这一新的学科已经诞生。

1.3 细胞的分子基础

生命是物质的，是一种特殊形式的物质运动，它是物质、能量和信息诸变量在特定时空的“表演”，其运转有赖于生命系统有组织的守时和对空间环境的合拍。所有的细胞都是由水、蛋白质、糖类、脂类、核酸、盐类和各种微量的有机化合物所组成（表 1-1）。蛋白质、糖类、核酸和脂类等化合物也被称为生物分子（biomolecule）。

表 1-1 细菌细胞的化学组成

化学成分	占细胞的重量/%	每种分子的类型数
水	70	1
无机离子	1	20
糖及其前体	1	250
氨基酸及其前体	0.4	100
核苷及其前体	0.4	100
脂肪酸及其前体	1	50
其他小分子	0.2	约 300
大分子（蛋白质、核酸和多糖）	26	约 3000

1.3.1 细胞中的水

生命来自于水，细胞中水的含量最高，通常占细胞总量 70%～80%（图 1-6）。细胞中的所有反应都是在水中进行的，所以水是细胞生命活动的介质。

相邻水分子间的关系是靠氢键维系的（图 1-7），氢键赋予水分子一些独特的性质，而这些性质对于生活细胞是十分重要的。首先，氢键能够吸收较多的热能，将氢键打断需要较高的温度，所以氢键可维持细胞温度的相对稳定。第二是相邻水分子间形成的氢键使水分子具有一定的黏性，这样使水具有较高的表面密度。第三，水分子间的氢键可以提高水的沸点，这样使它不易从细胞中挥发掉。

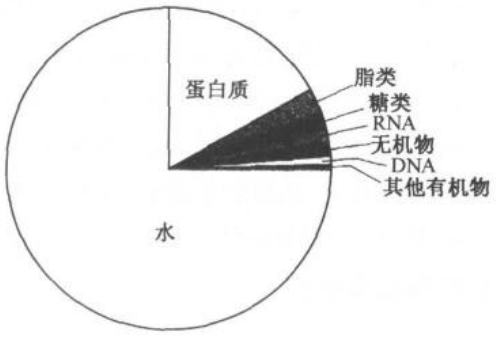


图 1-6 细胞中各主要成分的相对含量
（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

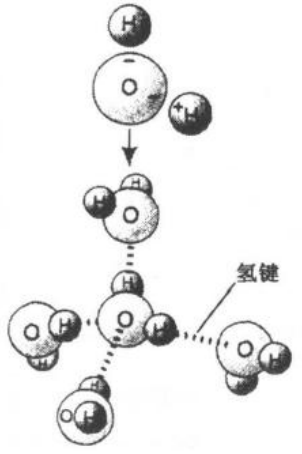


图 1-7 水分子中的氢键
（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

水在细胞中既是反应剂也是溶剂。水分子参与了生命活动的一些重要反应，在大分子的合成过程中水是产物，而在分解反应中水是反应剂。

除了作为反应剂外，由于水是极性分子，所以是各种极性有机分子和离子的最好溶剂，主要是靠氢键的形成使这些分子和离子得以溶解（图 1-8）。

细胞中的水以两种形式存在：游离水和结合水。游离水是细胞代谢反应的溶剂；结合水则是以氢键和蛋白质结合的水分子，占细胞内全部水的 4.5%，是原生质结构的一部分。

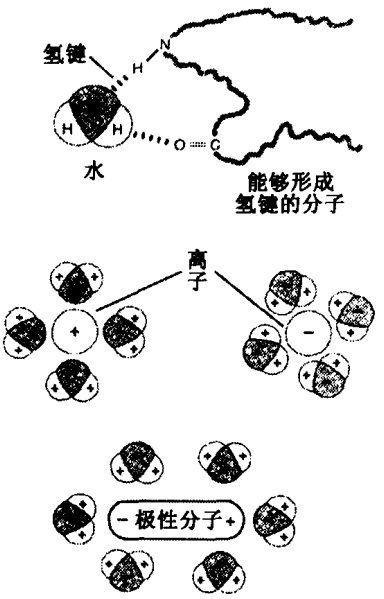


图 1-8　水的溶剂作用
（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

1.3.2　无机盐

生物小分子包括无机化合物和有机化合物两类，无机化合物中主要是水和无机盐。

无机盐是细胞的重要成分，并且是维持细胞生存环境的重要物质。根据无机离子在细胞内的作用分为 4 大类：①大分子的结构成分：主要是 C、H、N、O、P、S 等；②各种酶反应所需的离子，主要是 Ca^{2+}、Cu^{2+}、Mg^{2+}、K^{+}、Na^{+}、Cl^{-} 等；③各种酶活性所需的基础微量元素，包括 Co^{2+}、Cu^{2+}、Fe^{3+}、Mn^{2+}、Zn^{2+} 等；④某些生物需要的特殊微量元素，如碘、铯、溴等。

无机离子的功能有：维持细胞内的 pH 和渗透压，以保持细胞的正常生理活动；同蛋白质或脂类结合组成具有特定功能的结合蛋白，参与细胞的生命活动；作为酶反应的辅助因子。

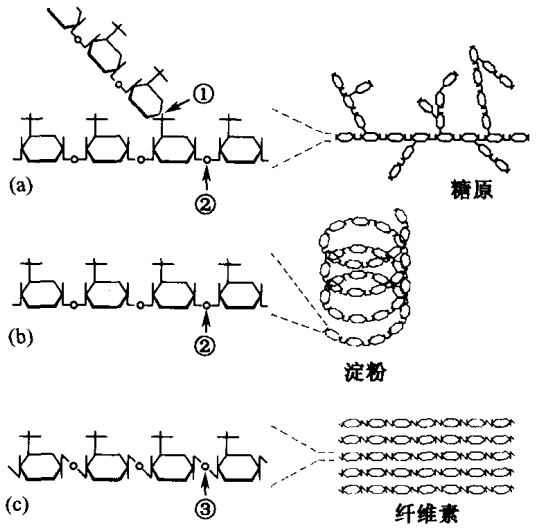


图 1-9　相同的单糖构成不同的多糖
（引自 Karp, 1996）

1.3.3　有机小分子

细胞内有 4 类有机小分子：单糖、脂肪酸、氨基酸和核苷酸。细胞内的有机小分子约占细胞总有机物的 1/10，但却有许多不同的种类。

1.3.3.1　糖类

糖是细胞的营养物，包括单糖、二糖、低聚糖（2～6 个糖）和多糖（由几百到几千个单糖组成），其中多糖属于生物大分子。葡萄糖是较简单的糖，也是细胞的主要营养物质，它经过一系列氧化反应，释放出能量，最终变成水和 CO_2。

单纯的多糖由许多葡萄糖残基组成，如动物细胞中的糖原和植物细胞中的淀粉。它们是

细胞内贮存的营养物质，提供细胞代谢所需的能源（图 1-9）。

1.3.3.2 脂

脂肪酸是脂的主要成分，是细胞膜的组分。细胞内几乎所有的脂肪酸分子都是通过它们的羧酸基团与其他分子共价连接。各种脂肪酸的碳氢链长度及所含碳-碳双键的数目和位置的

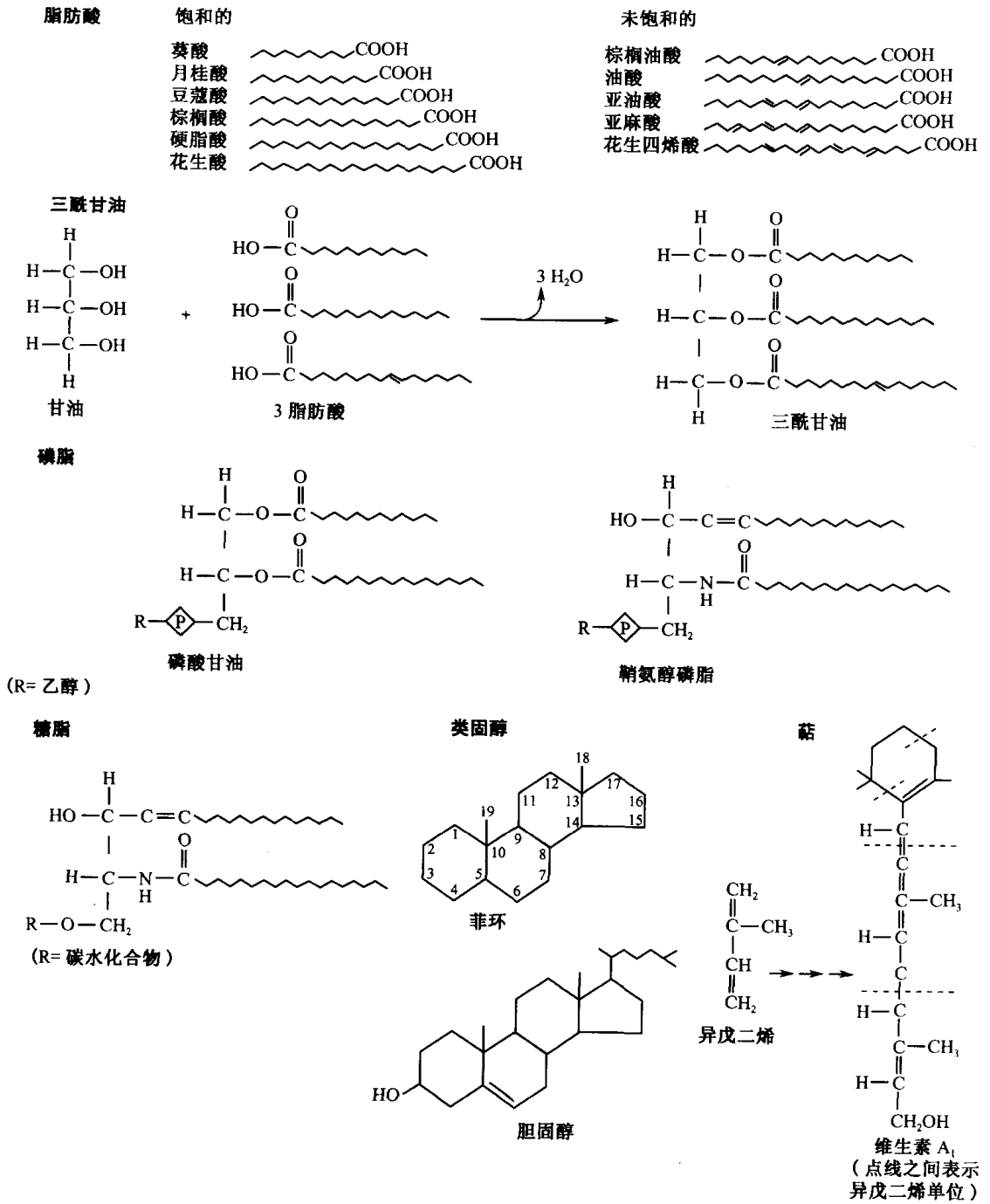


图 1-10　细胞内 6 类不同的脂（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

不同，决定了它们不同的化学特性。

脂肪酸是营养价值较高的营养物，按重量比计算，脂肪酸分解产生的能量，相当于葡萄糖所产生能量的两倍。脂肪酸在细胞内最重要的功能是构成细胞结构。

除了脂肪酸外，细胞内还有其他一些脂类（图 1-10）。

1.3.3.3 核苷酸

核苷酸是组成核酸的基本单位，每个核苷酸分子由一个戊糖（核糖或脱氧核糖）、一个含氮碱基（嘧啶或嘌呤）和一个磷酸脱水缩合而成（图 1-11）。

细胞中主要含有 5 种含氮碱基：胞嘧啶（C）、胸腺嘧啶（T）、尿嘧啶（U）、鸟嘌呤（G）、腺嘌呤（A）。主要形成 8 种核苷酸：腺苷酸（AMP）、尿苷酸（UMP）、鸟苷酸（GMP）、胞苷酸（CMP）、脱氧腺苷酸（dAMP）、脱氧胸苷酸（dTMP）、脱氧鸟苷酸（dGMP）、脱氧胞苷酸（dCMP）。核苷酸除组成脱氧核糖核酸（DNA）和核糖核酸（RNA）外，有些核苷酸在细胞内起重要作用，例如三磷酸腺苷（ATP）是细胞内化学能的载体，参与细胞内化学反应间能量传递。环腺苷酸（cAMP）是含嘌呤环状磷酸衍生物，作为细胞内通讯的信号分子，控制细胞内许多不同反应的速度。

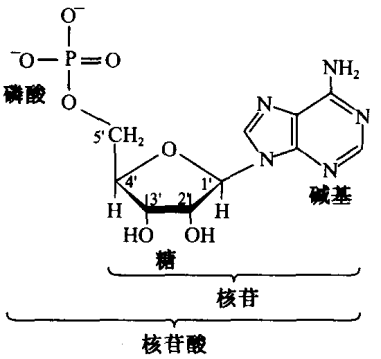


图 1-11 核苷酸的组成单位
（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

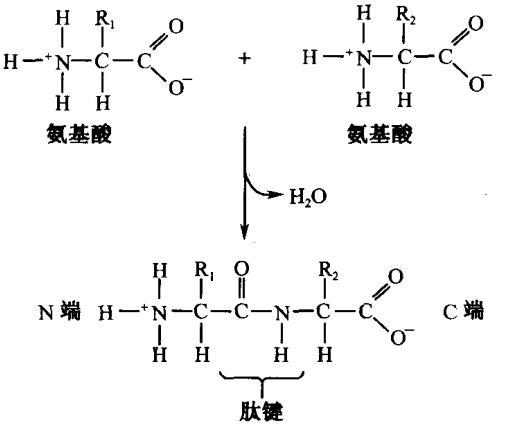


图 1-12 两个氨基酸之间通过脱水形成肽键

1.3.3.4 氨基酸

细胞内主要有 20 种氨基酸，它们的差别主要是 R 侧链不同，R 侧链决定了氨基酸的化学性质。氨基酸是组成蛋白质的基本单位，蛋白质是长的线性的氨基酸多聚体，这些氨基酸通过一个氨基酸的羧基与另一个氨基酸的氨基之间形成的肽键而首尾相连，构成多肽链（图 1-12）。多肽链的一端具有游离的氨基，称为氨基端，另一端具有游离的羧基，称为羧基端。多肽链中氨基酸残基的侧链通常不参加共价键形成，它们的理化特性决定了所组成蛋白质的特性，是蛋白质多种复杂功能的基础。

1.3.4 生物分子及其功能

细胞中的有机分子，根据它们在细胞代谢活动中的作用可分为4种不同类型。

生物大分子　构成细胞的基本结构，并且执行细胞的基本功能。生物大分子不仅相对分子质量大，而且与小分子有着截然不同的生物学特性。细胞内有4种类型的生物大分子：核酸、蛋白质、多糖以及某些类型的脂类，前三种是由单体构成的多聚体。细胞内大约有3000种大分子。生物大分子的功能取决于构成它们亚单位的种类和排列顺序。

大分子的构件　细胞内大多数生物大分子的半衰期都很短，它们不断地被降解，并被新的生物大分子所取代。所以细胞内有许多构成大分子的构件，如单糖、氨基酸、核苷、脂肪酸等。

代谢物　细胞内的分子具有十分复杂的结构，通常要一步一步地合成。细胞中有许多不同的代谢途径，发生不同的化学反应。在不同的代谢途径中，通常先合成的物质是后合成物质的前体。

非细胞功能分子　这是非常广泛的一类分子，但是量并非很大。这类分子包括各种维生素、蛋白类激素、能量储存分子（如ATP）、某些磷酸化的物质以及代谢废物等。

1.3.4.1 多糖

多糖（polysaccharide）是细胞的重要支持材料，是细胞壁的主要结构成分。青霉素之所以能够抑制革兰氏阳性菌的生长，就是阻止了细胞壁中特殊糖链的形成。

糖同蛋白质结合形成糖蛋白。在哺乳动物的组织、体液及分泌物中都有糖蛋白，具有不同的功能。植物的糖蛋白一部分与细胞壁的多糖结合，另一部分以可溶的形式存在。

糖蛋白及其糖链具有很多重要的作用：①作为机体内外表面的保护剂及润滑剂，如鱼体表面黏液中就含有高唾液酸的糖蛋白，能防止水分的丧失。消化道、呼吸道、尿道等体腔黏膜能帮助运输、保护体腔不受机械、化学损伤和微生物感染及润滑等功能；②作为载体与维生素、激素、离子等结合，有助于这些物质在体内转移和分配；③参与细胞识别，是细胞识别的重要分子，几乎所有动物细胞表面都有少量糖，它的作用好比是细胞联络的文字或语言。

蛋白质的糖基化对蛋白质分子的理化性质有很大影响：①溶解度。糖基化往往使蛋白质在水中的溶解度增大。但是，若糖链增长到一定程度，由于相对分子质量增大和形成高级结构，亦会出现憎水性增加的现象。②电荷。氨基糖解离后，应带正电荷。但是，天然存在的氨基糖的氨基都被 N -乙酰基取代，实际上相当于中性糖。许多糖链上有唾液酸或糖醛酸，解离后带负电荷，所以糖基化可能使蛋白质增加许多负电荷。

蛋白质的糖基化对蛋白质的生物功能也有很大影响。在迄今已知的上千种蛋白质中，50%以上是糖基化的。许多糖蛋白具有酶、激素、抑制剂等各不相同的生物活性，相当一部分糖蛋白，其分子中糖链是实现生物功能所必需的，去除或破坏糖链会使它们失去生物功能。但某些糖蛋白，去除糖链对其生物功能不会造成影响。

一些糖蛋白中的糖链通过增强蛋白质对热变性和蛋白水解酶的抗性间接增强糖蛋白的生

物学功能。

糖基化对蛋白质合成后加工和运输的影响也是很大的。例如艾滋病病毒的外壳糖蛋白gp120和gp41就是由前体蛋白分子gp160加工而来的，这种切割加工的信号就是*N*-乙酰氨基乳糖型糖链。

1.3.4.2 核糖核酸与脱氧核糖核酸

脱氧核糖核酸即是DNA分子，是遗传物质，只有一种类型，其结构是双螺旋的(图1-13)。

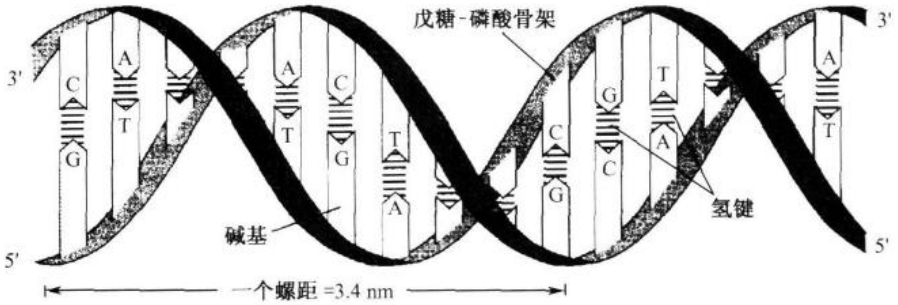


图1-13 DNA的结构

RNA即是核糖核酸，种类较多，有tRNA、rRNA、mRNA，还有一些存在于细胞核和细胞质中的小分子RNA，它们具有不同的功能，在某些病毒中RNA是遗传物质。

1.3.4.3 蛋白质

蛋白质是细胞内行使各种生物功能的生物大分子，估计在一个典型哺乳动物细胞中有10 000种不同的蛋白质执行着不同的功能（表1-2）。

表1-2 细胞内蛋白质的某些功能

功能	举例	功能	举例
结构材料	胶原、角蛋白	激素	胰岛素、生长激素
运动	肌动蛋白、肌球蛋白	物质运输	Na^+-K^+泵
营养储存	酪蛋白、铁蛋白	信号转导	乙酰胆碱受体
基因调控	*lac* 操纵子	渗透压调节	血清白蛋白
免疫作用	抗体	毒素	白喉和霍乱毒素
电子转移	细胞色素	酶（催化作用）	氧化还原酶、连接酶等

组成蛋白质的基本构件只是20种氨基酸。为什么蛋白质却具有如此广泛的功能？根本原因是蛋白质具有几乎无限的形态结构，因此蛋白质仅仅是一类分子的总称。换句话说，蛋白质之所以有如此广泛的作用，是因为蛋白质具有各种不同的结构，特别是在蛋白质高级结构中具有不同的结构域，而这种不同的空间构型使得蛋白质能够有选择地同其他分子进行相互

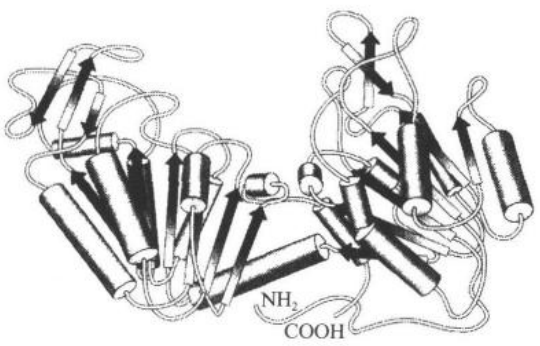


图 1-14　蛋白质的结构域（引自 Karp，1996）

作用，这就是蛋白质结构决定功能的特异性。正是由于蛋白质具有如此广泛特异性才维持了生命的高度有序性和复杂性。

近年来研究发现，很多大的蛋白质分子都是由两个或两个以上结合紧密的功能区域构成的，这种区域称为结构域（domain），结构域在功能上具有半独立性，它可与不同因子结合。图 1-14 显示了从马肌细胞中分离的磷酸甘油酸激酶（phosphoglycerate kinase）结晶的结构域，这两个结构域通过一个铰链连接起来。

1.3.5　细胞结构体系的组装

细胞是由化学物质组成的。由于细胞的生命活动是高度有序的，所以细胞内的化学物质不可能杂乱无章地堆积在一起，而是有规则地分级组装成复杂的细胞结构，如核糖体、细胞核、高尔基体和细胞骨架等。不仅如此，在多细胞有机体中，细胞要组成不同的组织，再由组织形成器官（图 1-15）。

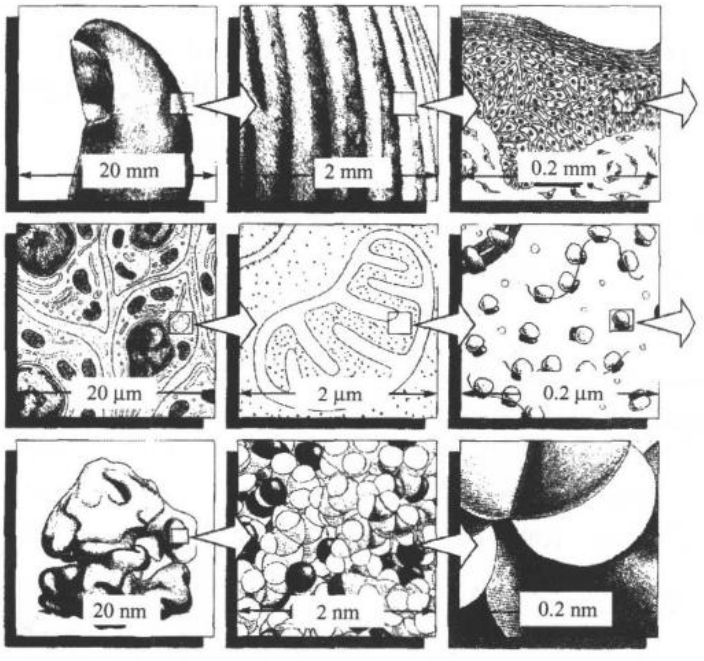


图 1-15　构成细胞的原子及其组织（引自 Karp，1996）

取拇指的一块皮肤组织，进行逐级 10 倍放大，最后显示的构成组织的原子。

由生物分子组装成细胞，可以粗略地分成 4 级：第一级是构成细胞的小分子有机物的形成，包括碱基、氨基酸、葡萄糖、软脂酸，这些构成了细胞的基石；第二级由基石组装成生

物大分子，包括 DNA、RNA、蛋白质、多糖；第三级由生物大分子进一步组装成细胞的高级结构，如细胞膜、核糖体、染色体、微管、微丝等；第四级由生物大分子组装成具有空间结构和生物功能的细胞器，如细胞核、线粒体、叶绿体、内质网、高尔基体、溶酶体、微体等。最后再由细胞器组成细胞。

各种生物大分子到底如何组装成有功能的细胞结构和组织是当前细胞生物学所要研究的基本问题。曾经对组装的机制提出过一些假说：①模板组装（template assembly）是指由模板指导，在一系列酶的催化下，合成新的、与模板完全相同的分子。这是细胞内一种极其重要的组装方式，DNA 和 RNA 的分子组装就属于此类。②酶效应组装（enzymatic assembly）是指相同的单体分子在不同的酶系作用下，生成不同的产物。如以葡萄糖为原料既可合成纤维素，也可合成淀粉，就看进入哪条酶促反应途径。③自组装（self-assembly）是指生物大分子借助本身的力量自行装配成高级结构，现代的概念应理解为不需要模板和酶系的催化，以别于模板组装和酶效应组装。其实，这种组装也需要一种称为分子伴侣的蛋白介导，如核小体的组装就需要核质素的介导。但是这些假说还远远不能解释组装的真正机制。

细胞内大分子组装的概念已不仅仅指生物分子如何组装成细胞结构和细胞器，越来越多的实验证据表明，细胞内许多代谢活动往往是以蛋白质与蛋白质，或蛋白质与核酸、蛋白质与磷脂组装成特定的复合物，这些复合物构成细胞结构体系的结构基础与功能单位，如 DNA 和组蛋白组装成的核小体是染色质结构的基本单位。

随着分子生物学研究的深入，人们更多地注意反应复合物的组装及其在生命活动中的作用，如 DNA 复制的引发体（primosome）、转录起始复合物、RNA 加工时形成的剪接体（spliceosome）、着丝粒和动粒等的组装。另外，三羧酸循环的酶系、线粒体的电子传递链等都是蛋白质组装成的反应复合物。

在生命活动中，随着细胞周期的进行和细胞代谢状态的不同，各种反应复合物，包括细胞器乃至整个细胞要不断进行组装和去组装。因此，细胞生命活动的基础是细胞组装活动，而这些组装活动又不能简单地归结于分子水平的活动，这就是为什么不能仅靠分子生物学而要靠细胞生物学解决生命科学问题的缘由。

1.4 细胞的类型和结构体系

在细胞的进化中，虽然经历了原核细胞和真核细胞两个不同的阶段，但是，原核细胞并没有消失，我们今天所见到的细胞仍然分为两大类：原核细胞和真核细胞。这一概念最早是 20 世纪 60 年代由著名细胞生物学家 Ris 提出的。

1.4.1 原核细胞

原核细胞（prokaryotic cell）是组成原核生物的细胞。这类细胞主要特征是没有明显可见的细胞核，同时也没有核膜和核仁，只有拟核，进化地位较低。原核生物分为两大系：古细菌（archaebacteria）和真细菌（eubacteria）。古细菌包括甲烷菌、嗜热菌等。大多数原核生物属于后者，其中包括支原体。最复杂的原核细胞是蓝细菌（cyanobacteria），如能进行光合作用

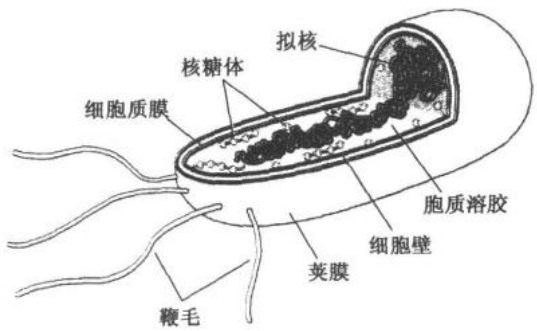


图 1-16　典型的细菌细胞形态结构
（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

的蓝绿藻（blue-green algae）。

细菌（bacteria）是原核细胞的主要类群。细菌细胞的基本特点是：遗传信息量少，内部结构简单，特别是没有分化成以膜为基础的专门结构和功能的细胞器与核膜（图 1-16）。

细菌的细胞通常很小，只有几个微米。细菌细胞的界膜，即细胞质膜的外侧都是被一层坚硬的细胞壁包裹起来。细胞壁的厚度有 15～100 nm，或更厚，有些细菌的表面还有一层荚膜。

原核细胞的细胞质膜是多功能的，其最重要的功能就是运输作用，包括营养物质的吸收、废物的排除、能量代谢等。细菌的细胞质膜往往会内陷折皱形成中膜体（mesosome），中膜体又称间体或质膜体，每个细胞有一个或数个中膜体，其中含有细胞色素和琥珀酸脱氢酶，为细胞提供呼吸酶，具有类似线粒体的作用，故称为拟线粒体。细菌质膜上还有许多受体蛋白，可被透过细胞壁的分子识别和结合，引起细胞的应答。细菌质膜还参与遗传物质的复制和分配，因为细菌没有细胞核，所以细菌的 DNA 在复制时只能结合在质膜上，然后进行细胞的分裂（图 1-17）。

细菌没有细胞核结构，仅为 DNA 与少量 RNA 或蛋白质结合物，也没有核仁和有丝分裂器。*E*.*coli* 的 DNA 是环状的，长为 4.2×10^6bp，约 4000 个基因。由于细菌没有核膜，DNA 的转录与蛋白质合成没有空间的隔离，所以细菌转录与翻译几乎是同步进行的，这是原核与真核生物的最主要的差别。细菌除了具有染色体 DNA 外，还有核外 DNA，即质粒 DNA。质

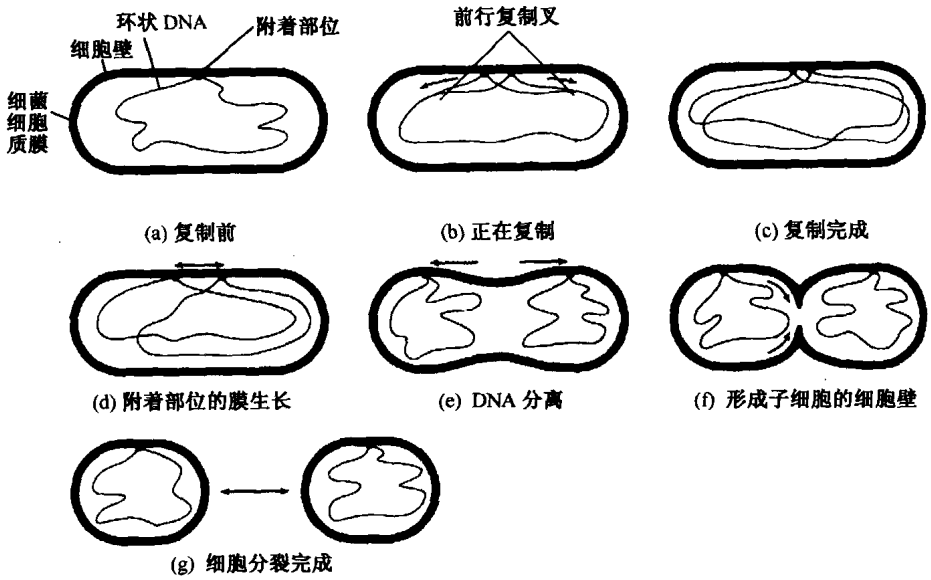


图 1-17　细菌质膜参与 DNA 的复制与分配

粒是比染色体小的遗传物质，为环状的双链 DNA，常常赋予细胞对抗生素的抗性。

细菌体表还有菌毛和鞭毛。菌毛有两种，一种短而细，具有呼吸作用；另一种是数量少但细长的性纤毛，为雄性菌所特有。鞭毛是细菌的运动器官，鞭毛蛋白的氨基酸组成与横纹肌中的肌动蛋白相似。

支原体是目前发现的最简单、体积最小的原核细胞，也是惟一一种没有细胞壁的原核细胞(图 1-18)。

支原体的大小介于细菌与病毒之间，一般直径为 0.1～0.3μm，能够通过滤菌器，并能独立生活。支原体形态多变，有圆形、丝状或梨形，光镜下难以看清其结构。电镜下观察支原体的细胞膜为三层结构。它有一环状双螺旋 DNA，并且均匀地分布在细胞内，没有类似细菌的核区（拟核），能指导合成 750 多种蛋白质。电镜下支原体细胞中惟一可见的细胞器是核糖体，每个细胞中约有 800～1 500 个。支原体感染细胞时，多吸附在细胞表面，或分散在细胞之间。

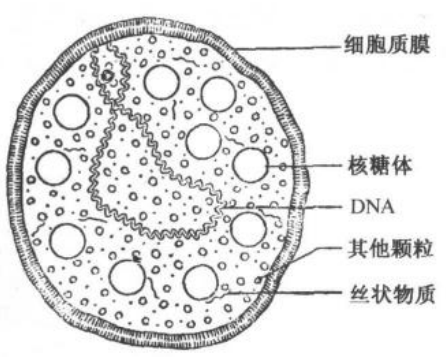


图 1-18　支原体细胞模式图
（引自郑国锠，1980）

支原体没有鞭毛，无活动能力，可以通过分裂法繁殖，也有进行出芽增殖的。

支原体是动物细胞培养的大敌，由于支原体寄生在细胞中，所以培养细胞很容易被支原体污染，污染源主要是血清。

1.4.2　真核细胞的两种主要类型：动物细胞和植物细胞

真核细胞（eucaryotic cell）是构成真核生物的细胞，具有典型的细胞结构，有明显的细胞核、核膜、核仁和核基质。真核细胞的种类繁多，既包括大量的单细胞生物和原生生物细胞(如原生动物和一些藻类细胞)，又包括全部的多细胞生物（一切动植物）的细胞。

真核细胞的主要特点是以生物膜为基础进一步分化，使细胞内部产生许多功能区室，它们各自分工负责又相互协调和协作。

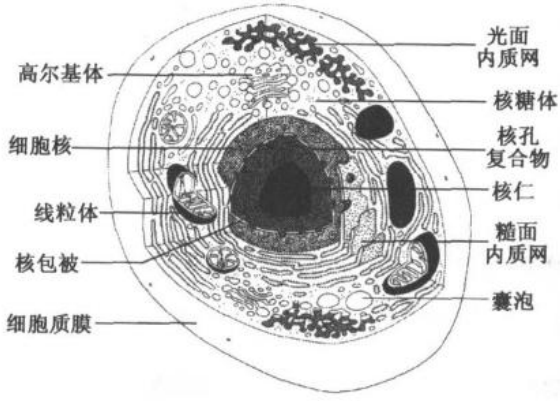


图 1-19　动物细胞模式图（引自 Wolfe，1993）

动物细胞是真核细胞的主要类型之一(图 1-19)。动物细胞的表面没有细胞壁，仅是一层单位膜。细胞内有一个明显可见的细胞核，被两层膜包裹着。

真核细胞核中含有大量的遗传物质，如人的细胞核中含有的染色体 DNA 的总长度达到 1m，某些生物细胞核中的 DNA 分子更长，如蛙的 DNA 总长度有 10m 之多。真核细胞内部结构比原核生物要复杂得多，还有许多纤维状的结构，它们不仅维持着真核细胞的形态，还有许多重要的功能，如参与细胞分裂、物质运

输等。除此之外，真核细胞中还有许多膜结合的细胞器。

真核细胞中另一主要类型是植物细胞（图 1-20）。动物细胞具有的结构，植物细胞基本都有，但是植物细胞还有一些独特的结构，包括细胞壁、质体、中央液泡等（表 1-3）。液泡是植物细胞特有的结构，它是植物细胞的代谢库，起调节细胞内环境的作用。液泡是由膜包围的封闭结构，内部是水溶液，溶有盐、糖与色素等物质，溶液的浓度可以达到很高的程度。液泡的另一个作用可能作为渗透压计（osmometer），使细胞保持膨胀的状态。

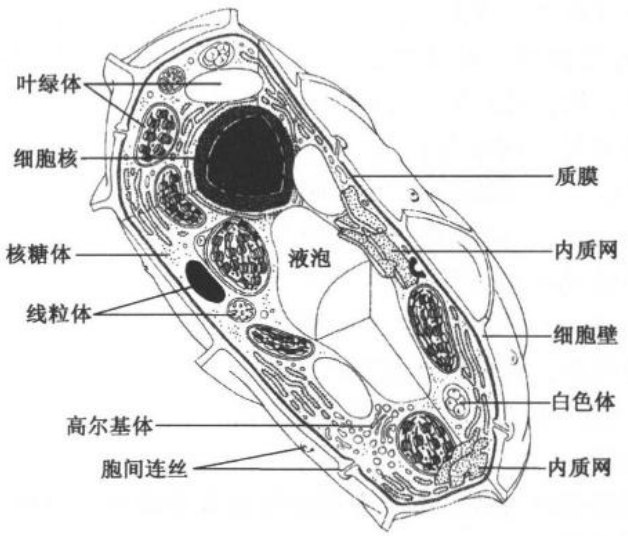


图 1-20　植物细胞模式图（引自 Wolfe，1993）

表 1-3　动物细胞与植物细胞的比较

细胞器	动物细胞	植物细胞
细胞壁	无	有
叶绿体	无	有
液泡	无	有
溶酶体	有	无
圆球体	无	有
乙醛酸循环体	无	有
通讯连接方式	间隙连接	胞间连丝
中心体	有	无
胞质分裂方式	收缩环	细胞板

1.4.3 真核细胞的结构体系

将真核细胞内的结构体系归纳起来可分为三大系统：生物膜体系、遗传信息表达体系、细胞骨架体系。

1.4.3.1 生物膜体系

真核生物在进化过程中，细胞体积不断增大，因而出现了细胞内部结构的分化，最主要的特征是以质膜为基础的既独立又相互联系的膜结构系统。这些结构及细胞器包括细胞质膜、核膜、内质网、高尔基体、溶酶体、线粒体和叶绿体等。

生物膜体系（biomembrane system）的基本作用是为细胞提供保护。质膜将整个细胞的生命活动保护起来，并进行选择性的物质交换；核膜将遗传物质保护起来，使细胞核的活动更加有效；线粒体和叶绿体的膜将细胞的能量发生同其他的生化反应隔离开来，更好地进行能量转换。

生物膜体系为细胞提供较多的质膜表面，使细胞内部结构区室化。由于大多数酶定位在膜上，大多数生化反应也是在膜表面进行的，膜表面积的扩大和区室化使这些反应有了相应的隔离，效率更高。

另外，生物膜体系为细胞内的物质运输提供了特殊的运输通道，保证了各种功能蛋白及时准确地到位而又互不干扰。例如溶酶体的酶合成之后不仅立即被保护起来，而且一直处于监护之下被运送到溶酶体小泡。

1.4.3.2 遗传信息表达体系

遗传信息表达体系（genetic expression system）又称为颗粒纤维结构体系，包括细胞核和核糖体。细胞核中的染色质是纤维结构，由 DNA 和组蛋白构成。染色体的一级结构是由核小体组成的串珠结构，其直径为 10nm，又称为 10 纳米纤维。核糖体是由 RNA 和蛋白质构成的颗粒结构，直径为 15～25nm，由大小两个亚基组成，它是细胞内合成蛋白质的场所。

1.4.3.3 细胞骨架体系

细胞的体积虽小，细胞内却是热闹非凡，各种生化反应瞬息万变，为了保证细胞生命活动的有序进行，细胞必需维持立体结构，这就需要依靠细胞骨架体系（cytoskeleton system）。细胞骨架是由蛋白质与蛋白质搭建起的骨架网络结构，包括细胞质骨架和细胞核骨架。细胞骨架体系的主要作用是维持细胞的一定形态，使细胞得以安居乐业。细胞骨架对于细胞内物质运输和细胞器的移动来说又起交通动脉的作用；细胞骨架还将细胞内基质区域化；此外，细胞骨架还具有帮助细胞移动行走的功能。细胞骨架的主要成分是微管、微丝和中间纤维。

1.4.4 真核细胞与原核细胞的比较

原核细胞和真核细胞无论在结构上还是在功能上都有许多相同之处（表 1-4），但真核细

胞具有许多原核细胞所没有的特点（表 1-5）。

表 1-4　原核细胞与真核细胞的相同点

序号	内　容
1	都具有类似的细胞质膜结构
2	都以 DNA 作为遗传物质，并使用相同的遗传密码
3	都以一分为二的方式进行细胞分裂
4	具有相同的遗传信息转录和翻译机制，有类似的核糖体结构
5	代谢机制相同（如糖酵解和 TCA 循环）
6	具有相同的化学能贮能机制，如 ATP 合成酶（原核位于细胞质膜上，真核位于线粒体膜上）
7	光合作用机制相同（蓝细菌与植物相比较）
8	膜蛋白的合成和插入机制相同
9	都是通过蛋白酶体（蛋白质降解结构）降解蛋白质（古细菌与真核细胞相比较）

表 1-5　真核细胞特有的特点

序号	内　容
1	细胞分裂分为核分裂和细胞质分裂，并且分开进行
2	DNA 和蛋白质结合压缩成染色体结构，形成有丝分裂的结构
3	具有复杂的内膜系统和细胞内的膜结构（如内质网、高尔基体、溶酶体、过氧化物酶体、乙醛酸循环体、内体等）
4	具有特异的进行有氧呼吸的细胞器（线粒体）和光合作用的细胞器（叶绿体）
5	具有复杂的骨架系统（包括微丝、中间纤维和微管）
6	有复杂的鞭毛和纤毛
7	具有小泡运输系统（胞吞作用和胞吐作用）
8	含有纤维素的细胞壁（如植物细胞）
9	利用微管形成的纺锤体进行细胞分裂和染色体分离
10	每个细胞中的遗传物质成双存在，二倍体分别来自于两个亲本
11	通过减数分裂和受精作用进行有性生殖

1.5　病毒——非细胞的生命体

细胞虽然是地球上主要的生命形式，但并非是惟一的生命形式，病毒也是生命体，但它却不具有细胞结构。

1.5.1　病毒是比细胞更小的生命体

病毒是 19 世纪末通过对疾病的研究发现的，无法用光学显微镜观察。病毒没有细胞结构，不能在体外独立生活。在电子显微镜下可观察到病毒颗粒的体积大约在 10～100 nm 之间，比细胞小得多。病毒的结构简单，主要由两部分组成：蛋白质外壳和遗传物质的核。病毒的遗传物质可以是 DNA，也可是 RNA，前者称为 DNA 病毒，后者称为 RNA 病毒。病毒的形态各异，有正二十面体的、有柱形的、也有丝状的（图 1-21）。

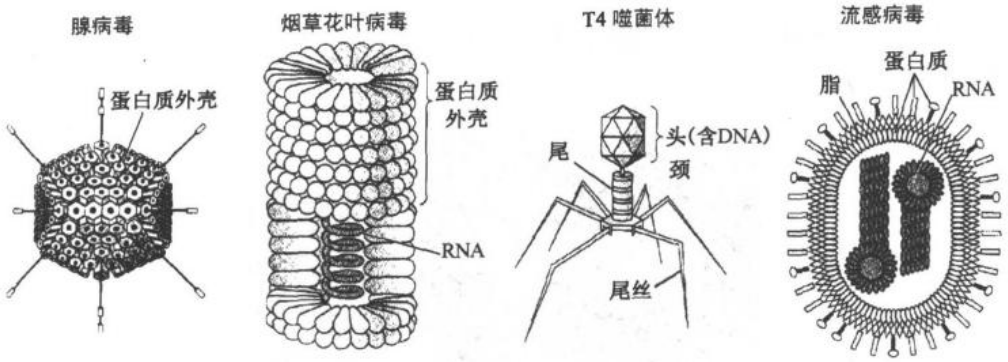


图 1-21　常见病毒的形态和结构（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

1.5.2　病毒只能在细胞中增殖

病毒不仅没有细胞结构，而且也不能独立生存，只能在活细胞中进行增殖。病毒的增殖周期包括 5 个基本过程：

吸附（adsorption）：病毒对细胞的感染起始于病毒蛋白质外壳同宿主细胞表面特殊的受体结合，受体分子是宿主细胞膜或细胞壁的正常成分。因此，病毒的感染具有特异性。

侵入（penetration）：病毒吸附到宿主细胞表面之后，将它的核酸注入到宿主细胞内。病毒感染细菌时，用酶将细菌的细胞壁穿孔后注入病毒核酸；对动物细胞的感染，则是通过胞吞作用，病毒完全被吞入。

复制（replication）：病毒核酸进入细胞后有两种去向，一是病毒的遗传物质整合到宿主的基因组中，形成溶原性病毒；第二种情况是病毒 DNA（或 RNA）利用宿主的酶系进行复制和表达。

成熟（maturation）：一旦病毒的基因进行表达就可合成病毒装配所需的蛋白质外壳，并将病毒的遗传物质包裹起来，形成成熟的病毒颗粒。

释放（release）：病毒颗粒装配之后，它们就可从被感染的细胞中释放出来进入细胞外，并感染新的细胞。有些病毒释放时要将被感染的细胞裂解，有些则是通过分泌的方式进入到细胞外。

1.5.3　冠状病毒与 SARS

2003 年春在我国和世界 20 多个国家发生了一种传染性病毒病，导致严重急性呼吸道综合征（severe acute respiratory syndrome，SARS），即我国所说的非典型肺炎。同年 4 月 16 日，WHO 正式确认 SARS 病毒是 SARS 的病因，这是一种新型的冠状病毒。

冠状病毒科（Coronaviridae）的病毒成员仅感染脊椎动物，可引起人和动物呼吸道、消化道、肝脏和神经系统产生疾病。冠状病毒最早于 1937 年从鸡中分离，1965 年 Tyrrell 和 Bynoe 首次用有纤毛的胚状气管在体外培养了人的冠状病毒，约有 15 个种，不仅感染人，也感染

牛、猪、猫、狗等。

冠状病毒粒子呈球状，形似冠状而得名。其直径为 60～220nm，有包膜。包膜上有 2～3 种糖蛋白（图 1-22）。

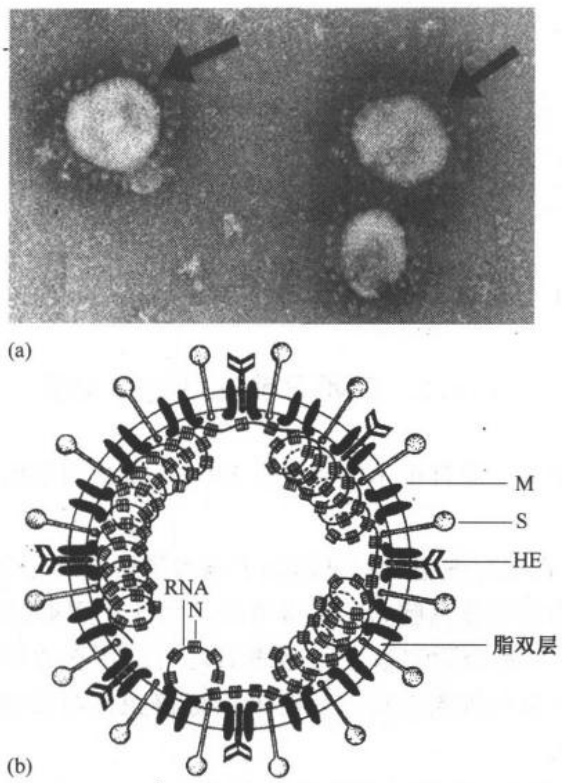


图 1-22　冠状病毒的形态结构（引自 Fields，1996）

（a）HCV-OC43 冠状病毒电镜照片；（b）冠状病毒结构模式图

M 蛋白（membrane protein），是糖蛋白，横穿包膜，其 N 端的丝氨酸或苏氨酸残基上可以产生糖基化。M 蛋白的作用是出芽和病毒包膜的形成。

S 蛋白（spike protein），构成长的杆状包膜突起，S 蛋白突起具有多方面的功能，它负责结合敏感细胞受体，诱导病毒包膜和细胞膜以及细胞之间的膜融合，作为主要抗原刺激机体产生中和抗体和介导细胞免疫反应。

E 蛋白属包膜蛋白，是一种小的与包膜形成相关的蛋白。

核衣壳蛋白 N 是一种碱性磷蛋白，具有 3 个结构域，其中央区同基因组 RNA 结合，形成卷曲的核衣壳螺旋。N 蛋白有两个方面的功能：一方面与病毒 RNA 复制有关，另一方面通过与 M 糖蛋白 C 端相互作用，可引起病毒出芽。

HE 蛋白即血凝素-酯酶（hemagglutinin-estemse，HE），HE 蛋白构成包膜的短突起。现在认为 HE 可能与冠状病毒早期吸附有关。

冠状病毒基因组为（+）ssRNA，长约 27～31kb，其基因组 5′端有帽子结构，3′端有 poly（A）尾，紧接帽子结构之后是 60～80 个碱基的先导 RNA 序列和 200～500 个碱基的非编码区。

SARS病毒是一种新型的冠状病毒，目前已发现有十几个变种。这种病毒潜伏期2～7天。患者通常有高于38℃的发热，并会伴有寒战，或者其他如头痛、倦怠和肌痛。潜伏期后进入下呼吸道期，患者伴有包括发热、干咳无痰、呼吸困难，甚至低氧血症（呼吸困难、紫绀、缺氧早期心动过速、血压升高、严重时出现心动过缓、血压下降，甚至休克）等综合征，严重患者通常都需要气管插管或者呼吸机维持。

95%感染SARS病毒的人能够治愈。人体可以针对病毒产生抗体，表明SARS是可治的，同时也是可控和可防的。只要依靠科学、保持良好的心态，人类一定能够最终战胜SARS。

从细胞生物学的角度，用SARS（smile and remain smile）去战胜SARS（severe acute respiratory syndrome）不失为一种有效的抗击疾病的好方法。

1.6 细胞生命的进化

细胞是由分子和细胞器构成的错综复杂的生命体，细胞内每一种分子和细胞器都能执行一种或多种功能。人们对细胞的认识是在实验室里将细胞打开，然后分离各种细胞器和生物分子，分别研究它们的功能，但是人们能够打开的细胞只是当今生活的细胞，是进化到十分高级的细胞，而无法获得远古时期的活细胞。在进化的过程中细胞生命活动的分子是如何形成的？最早的细胞是如何产生的？真核细胞又是如何起源的？

1.6.1 细胞生命的起源

导致细胞生命形成的关键因素是地球的形成及地球大气层条件的变化。一般将细胞生命的起源分为5个阶段：①地球和原始大气层的形成；②有机分子的自发形成；③分子聚合体的形成；④生命初级聚合体的形成；⑤原始细胞的形成。

1.6.1.1 有机分子的自然形成

地球上形成有机分子，是细胞生命起源的先决条件。

根据化石资料分析，地球上最早的细胞出现在35亿年前。最早的细胞是如何产生的？关于地球上细胞生命起源有两种假说，一种假说认为细胞是由已存在于地球上的分子产生的，另一种假说则认为细胞是从别的宇宙空间来到地球的。在19世纪，认为细胞来自别的星球的假说讨论十分激烈，有人认为地球是45亿年前形成的，第一个细胞是35亿年前出现的，在10亿年期间，是难以形成如此复杂的细胞，但是这种观点提不出一点证据。相反，细胞产自地球的假说却得到许多证据的支持，如细胞生命形式的形成与环境条件有关，在地球存在的第一个10亿年期间，地球表面被大量的水蒸气包围，有大量来自太阳的紫外射线，并且还有雷雨和闪

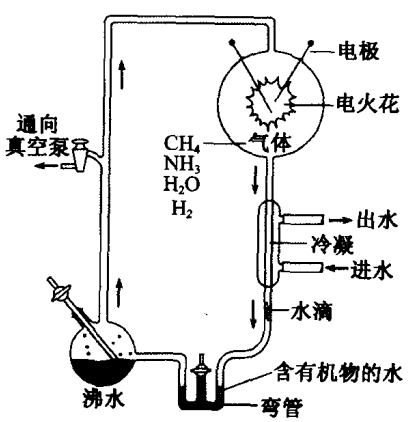


图1-23 Miller证明地球上的有机分子自动合成的装置（引自Wolfe，1993）

电。

组成细胞的分子主要是有机分子，所以要形成细胞，地球上首先必须形成有机分子。20世纪20年代后期，（前）苏联的生化学家Oparin提出地球上的有机分子是在合适的化学和物理条件下自然形成的。1953年，这一假说得到了实验的支持。实验的设计者是Miller，当时是一位研究生。他设计了一个实验装置，并通过实验证明在合适的物理化学条件下可以自动合成有机分子（图1-23）。

Miller推测，大气层中含有甲烷和氨，也含有氢和水蒸气。他把这些气体一起放入实验装置中，然后一直与电火花接触，在这一装置中靠沸水提供水蒸气。反应一个星期后分析产物。令人惊讶的是，产物中有大量的有机物，包括尿素、生物和非生物的氨基酸等，实验证明了在雷电作用下能够利用大气中的分子合成有机分子。也就是说在进化的某一过程中地球上有了构成细胞生命物质的基本单元：氨基酸、碱基、单糖等，为细胞的起源做好了物质准备。

1.6.1.2 分子聚合体的形成

从分子到原始细胞的生命进化中，两个主要事件是遗传信息的形成和细胞膜的形成。遗传信息的形成是生命进化的转折点。核酶（ribozyme）的发现，说明RNA在生命起源中起了主导作用，它比DNA和蛋白质的起源都早。有机分子如何聚集形成分子聚合体，要有两个基本条件，即溶液中分子能够沉淀出来，并能聚集排列形成稳定的结构，或者又能重新溶解。这种聚集有几种不同的机制，最典型的是脂双层结构的自动装配，为细胞质膜的形成提供了可能。

1.6.1.3 生命的初级聚合体的形成

生命的初级聚合体的形成包括：①如何利用能源驱动化学反应途径的进行；②酶分子的形成以及酶催化反应途径的形成；③指导合成和再生的信息系统的形成。这里所指的生命初级聚合体包括生物大分子的形成（酶和ATP等）、代谢的生物途径的形成、能量转换、信息的形成。这些生命初级聚合体一旦形成，生命的雏形即已形成。

1.6.1.4 原始细胞的形成

突变和自然选择是导致细胞生命形式形成的主要因素。上述各阶段的分子进化可视为是有利的突变，而这种有利的突变则被自然选择下来。将前几个阶段形成的膜结构、酶分子、能量转换系统、遗传信息系统和各种温和代谢途径聚集在一起就形成了原始的细胞。

1.6.2 真核细胞的起源

真核细胞是由原核细胞进化而来，这是生物学家的基本共识。原核细胞向真核细胞进化的主要事件是呼吸代谢的发展和内膜系统的形成。细胞内两个与能量转换有关的细胞器线粒体和叶绿体的起源主要是通过内共生机制，而内膜系统则是通过质膜的内陷形成的（图1-24）。首先形成内质网和核膜，然后逐步形成高尔基体、溶酶体、内体等内膜系统的其他结

构，这样原核细胞就进化到低等真核细胞。

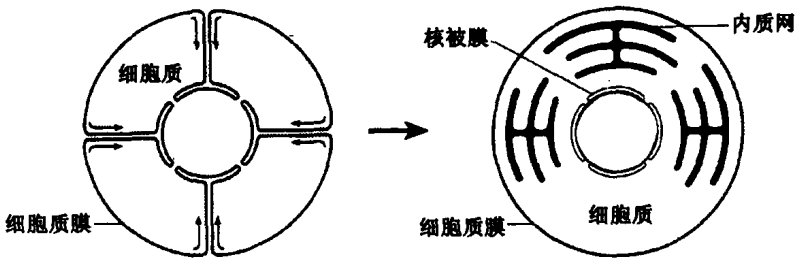


图 1-24　质膜内陷形成核膜和内质网的假定方式

1.6.3　从单细胞向多细胞进化

虽然一个细胞可以是一个生命体，但这种生命体毕竟太简单。在细胞进化过程中出现了细胞的集合体，进一步发展到多细胞机体。

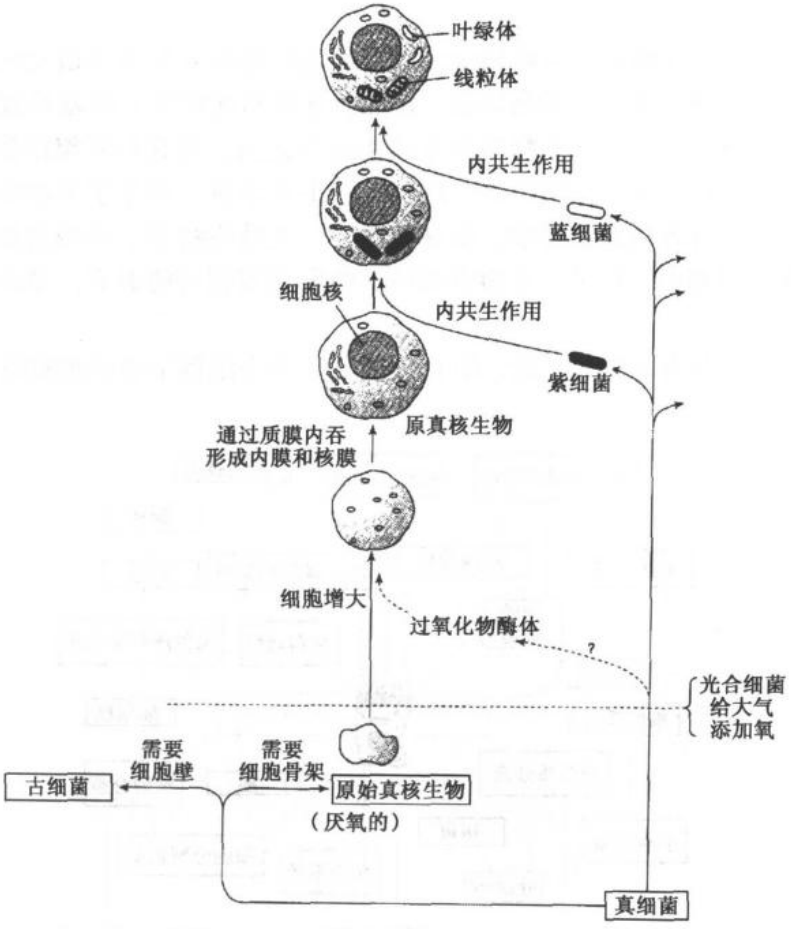


图 1-25　真核细胞进化的主要过程（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

细胞在向多细胞机体进化过程中，最重要的特点是出现细胞的分化，即在多细胞的机体内，各种细胞向不同方向发展，形成结构和功能各异的不同组织，但又互相协调成为一个有机的整体。

在多细胞的机体内，有一部分细胞高度特化，成为下一代机体的起源，这些细胞称为生殖细胞（germ cell），以别于机体内的其他细胞，即体细胞（somatic cell）。

细胞进化的主要事件示于图 1-25。

1.7 我国细胞生物学的发展战略

细胞生物学是一门重要的生命科学的分支学科。就细胞而言，它是一个全能的大工厂，有精细的分隔，严密的组织，有序的代谢活动，使细胞成为工作效率极高的单位。对于多细胞的真核生物来说，各种不同类型的细胞生活在一个共同的细胞社会，相互合作，共同维持生命有机体的各种生理功能。

1.7.1 细胞生物学的主要研究内容和发展方向

细胞生物学主要从细胞的不同结构层次以及细胞间的相互关系来研究细胞生命活动（生长、分裂、分化、遗传变异、运动和兴奋、传导、衰老和死亡等）的基本规律。从生命结构层次来看，细胞生物学位于分子生物学和个体生物学之间，同它们互相衔接、互相渗透。因此，从这一意义上来说，细胞生物学是一门承上启下的学科，和分子生物学一起同是现代生命科学的基础，并广泛渗透到遗传学、发育生物学、生殖生物学、神经生物学和免疫生物学等学科的研究中，和农业、医学、生物高新技术的发展有密切的关系，是生命科学的重要支柱之一。

细胞生物学研究的内容十分广泛，图 1-26 显示了当今细胞生物学研究的主要内容。

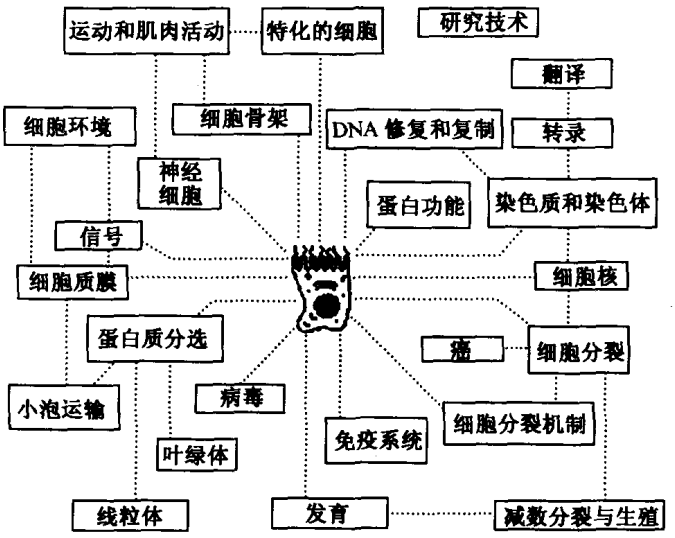


图 1-26 细胞生物学研究的范畴

1.7.2 我国细胞生物学发展战略

为了发展我国的细胞生物学研究，20 世纪 90 年代中期，国家自然科学基金委员会组织一批细胞生物学方面的专家就我国的细胞生物学研究制定了战略规划，提出了 13 个方面的重点研究方向。由于细胞生物学的发展十分迅速，规划中的某些内容现已发生了很大变化，但规划中提出的问题仍是当今细胞生物学的热点研究课题，也是细胞生物学课程的重点。因此，了解这些发展战略的基本内容，对于学习细胞生物学课程是有益的。

细胞的结构与机能　主要研究细胞膜、内质网、高尔基体、溶酶体、过氧化物酶体、线粒体等细胞结构和功能，侧重于信号的跨膜转导、蛋白质通道和穿膜机制、大分子的修饰、分选、定向运输、内吞、外吐的机理、核孔复合物如何调节核－质间运输的研究等。

染色体的结构及其基因表达调控　研究内容包括水稻及人基因组计划、染色体蛋白质与染色体骨架、染色体结构与基因表达调控之间的关系；染色体的构建及其高级结构；染色体步移复制、染色体的特化区域（如动粒、端粒、着丝粒、核仁组织区等）的结构与功能。

细胞骨架及核骨架系统　研究内容包括：微管、微管结合蛋白及分子发动机的机能；微丝、微丝结合蛋白及其与信号传递、物质传送、蛋白质合成的关系；中间纤维的结构、功能及其与细胞分化及进化的关系；细胞核骨架侧重研究核基质与核纤层、基质结合区（matrix-associated region，MAR）与核骨架结合蛋白的机能；染色体骨架与染色体包装的关系等。

胞外基质　研究作为细胞外基质支架的胶原与弹性蛋白及其与某些胶原性疾病和衰老间的关系；非胶原糖蛋白在细胞增殖、分化、癌转移等方面的作用；氨基聚糖和蛋白聚糖是膜的整合成分与辅助受体，它们与心血管病及老年病的关系。细胞外基质受体的活化与信号识别、信号转导的关系等.

细胞周期调控　包括对周期蛋白依赖性蛋白激酶及周期蛋白的功能研究、克隆这两个基因家族新成员并确定其功能、研究其调节网络，包括对癌基因、抑癌基因及 CKI 的研究与细胞衰老、凋亡和癌变的关系以及遍在蛋白、PKC、PKA、Ca^{2+}、MAPK 与细胞周期调控的关系等。

细胞分化、衰老、死亡及相关基因的研究　研究的重点是分离细胞分化的关键基因；研究分化与癌变的关系；*P53* 与细胞增殖、分化、癌变、逆转的关系；同源异型基因的研究；分化中基因群的相互作用；细胞衰老与原癌基因、抑癌基因及衰老相关基因；端粒与衰老的关系等。

细胞信号传导　细胞与细胞之间的信息传递机制是相当复杂的，细胞因子（cytokine）、激素与受体以及细胞内第二信使共同组成传递信息的网络，并依此对细胞周围环境发生应答。研究重点是信号分子的结构与机能、信号分子与受体相互作用机理、受体与原初反应。

细胞社会学　细胞社会学（cell sociology）是在体外研究细胞的社会行为，用人工的细胞组合研究不同发育时期的相同细胞或不同细胞的行为；研究细胞间的识别、黏连、通讯以及由此产生的相互作用、作用本质以及对形态发生的影响。

细胞结构体系的组装及细胞工程　主要研究生物大分子如何逐级组装并最终形成赖以进行生命活动的细胞结构体系。细胞是一个高度有组织有秩序而又瞬息万变的体系，应用分

析与综合的思维方法，人为拆卸、组装不同层次的细胞结构，研究其机能，将为细胞生物学的发展起到巨大的推动作用。

生殖有关的细胞生物学问题　生殖生物学对促进生物的繁殖、野生濒危动、植物的挽救和控制人口膨胀及优生优育方面均有重要意义。优先发展领域侧重于精子发生过程中与增殖、分化、变态有关的基因表达、基因克隆及其功能的研究；精子顶体反应的分子机理、精卵一级识别和二级识别的体外受精机理；胚胎植入启动分子机理及其信号转导；细胞黏附、迁移和侵入与着床进程中黏附因子、细胞外基质（ECM）和金属蛋白酶之间的相互作用等。

肿瘤的细胞生物学　肿瘤细胞生物学的研究主要集中于：肿瘤细胞结构、显微及亚显微结构水平及分子水平的癌的早期诊断；细胞周期因子的调节失控、细胞凋亡的失控、信号转导系统的障碍、肿瘤细胞的侵袭和转移的机理、肿瘤细胞标志的确定、基因治疗、肿瘤病因及癌变机理的研究。

进化细胞生物学　进化细胞生物学是介于进化生物学、细胞生物学、分子生物学、原生生物学与物种生物学之间的一门新兴交叉学科。在弄清真核细胞的起源与进化的基础上从进化的角度考察细胞生物学中一切重要的问题，侧重于从进化细胞生物学的角度进一步探讨结构与生命活动的进化关系，还包括新的有代表性生物的发现与研究，有关基因序列测定和比较研究等。

植物细胞工程　植物细胞工程（plant cell engineering）是植物生物技术的重要组成部分，在资源缺乏的新世纪中将发挥极为重要的作用，如对作物遗传性的改良、植物细胞体外培养生产贵重的代谢产物等。

21世纪人类将面临严重的挑战，细胞生物学作为生命科学中的重要基础学科，是连接整体与分子的重要一环，将会在新的生命科学世纪中发挥其重要作用。

展望未来，细胞生物学的前景无限广阔。

提　要

细胞是生物体结构和功能的基本单位，也是生命活动的基本单位。1665年胡克首先发现细胞。170年后，施莱登和施旺创立了细胞学说，从而解决了生命的同一性和共同起源。细胞生物学发展经历了四个阶段。1965年，Derobetis将其编著的《普通细胞学》改为《细胞生物学》，标志着细胞生物学的诞生，研究细胞及其生物学功能的科学称为细胞生物学。

细胞都具有膜屏障、遗传物质和核糖体，都能进行自我增殖。细胞形态多样，组成细胞的化合物有水、无机盐、小分子有机物以及核酸、蛋白质、多糖、脂类等生物大分子。细胞是物质的，生命是物质的特殊运动形式。

细胞分为原核细胞和真核细胞两大类，真核细胞主要有植物细胞和动物细胞两种类型。真核细胞有三大结构体系：生物膜体系、遗传信息表达体系、细胞骨架体系。病毒是非细胞的生命体。

本章还介绍了我国细胞生物学的发展战略。细胞生物学将会在新的生命科学世纪中发挥重要作用。

2 细胞生物学研究方法

生命科学是实验科学，它的很多成果都是通过实验得以发现和发展的。许多细胞生物学的重要进展以及新概念的形成，往往来自新技术的应用。因此，方法上的突破，对于理论和应用的发展具有巨大的推动作用。

2.1 显微成像技术

细胞生物学的建立和发展得益于光学显微镜（light microscope）的发明。因为有了光学显微镜，人们才有可能看到细胞的镜像。最早的光学显微镜是 1590 年 Z. Janssen 和他的侄子 H. Janssen 共同研制的。其后，胡克和列文虎克对光学显微镜的分辨率进行了极大的改进，

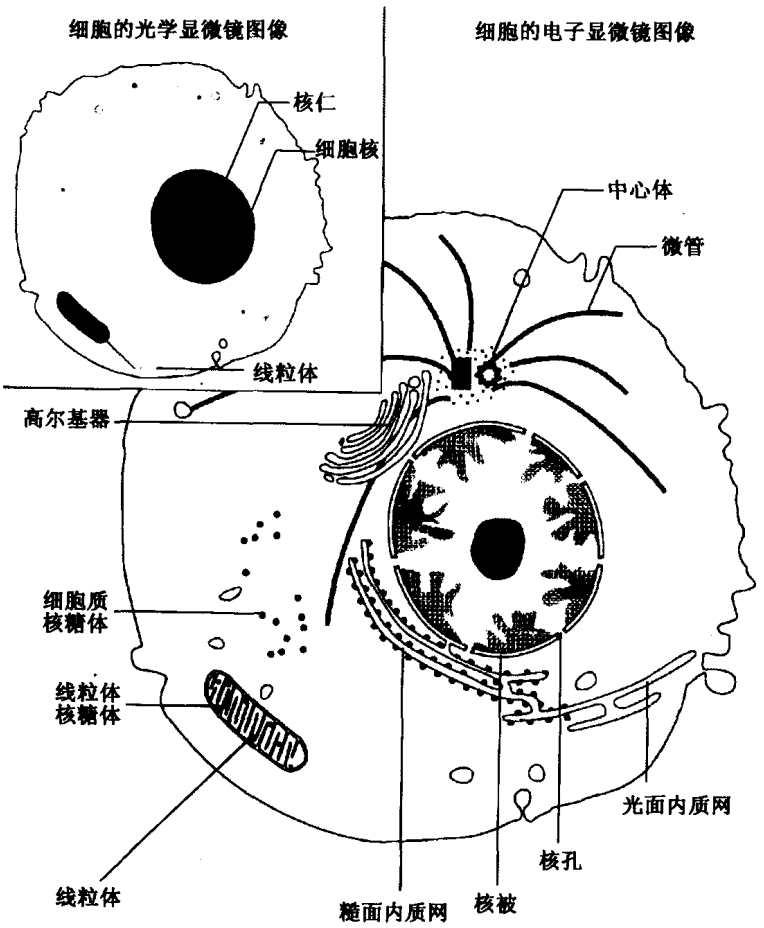


图 2-1 光学显微镜和电子显微镜下的细胞结构（引自 Bolsover *et al*., 1997）

由此发现了细胞并建立了细胞理论。

20 世纪 30 年代发展起来的电子显微镜导致细胞结构和功能的研究发生了一次革命，使生物学家得以从亚显微水平上重新认识细胞（图 2-1）。

2.1.1 光学和电子显微镜成像原理

无论是何种显微镜，镜像的形成都需要 3 个基本要素：①照明系统；②被观察的样品；③聚焦和成像的透镜系统（图 2-2）。

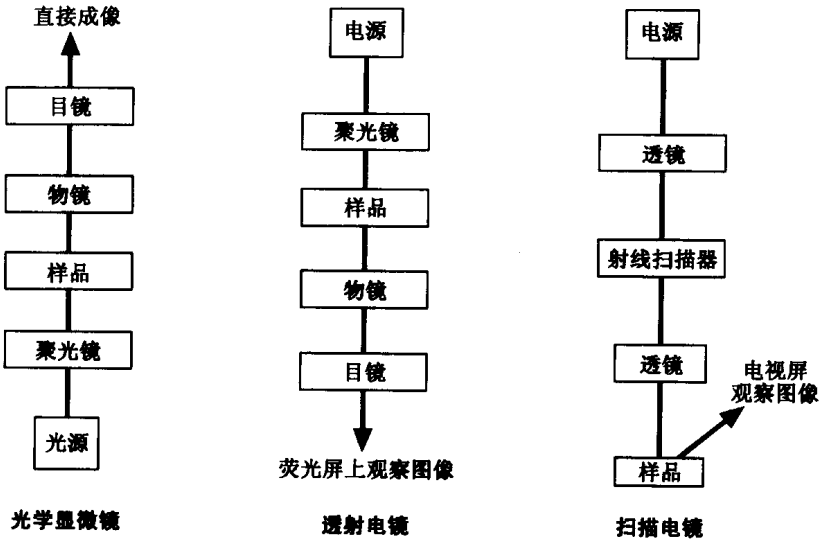


图 2-2 光学和电子显微镜的基本结构（引自 Bolsover *et al*., 1997）

在光学显微镜中，照明系统是可见光，使用的是玻璃透镜，可直接通过目镜观察镜像。在电子显微镜中，照明系统为电子束，使用电磁透镜，通过荧光屏观察样品的镜像。

尽管这两类显微镜的照明系统和装置的设计不同，但是它们所依据的原理相同，成像方式相似。当样品被放置在光或电子束的通路中，光束或电子束被改变的物理特征能够用肉眼观察或被显像板记录下来。

照明系统的波长是显微镜成像的一个重要因素，因为波长决定能被检测样品的最小极限。波长越长，波幅的跨度就越大，所能观察到的物体极限就越大（图 2-3）。

理解了波长和物体体积间的关系，就会认识到为什么小的物体只能用电子显微镜进行观察：电子的波长要比光子的波长小得多。因此，我们可以理解像病毒和核糖体这样的结构由于体积小而不能干扰光子波，但是很容易与电子波相互作用。

虽然光学和电子显微镜有很多差别，但是它们成像的光学原理是相同的，其中最重要的是光和电子都具有波的行为。当光和电子穿过透镜到达聚焦点时，由于波的干涉（interference）性质而成像。实际上通过透镜观察到的样品的镜像是通过透镜波的干涉累加或消除，即衍射（diffraction）的结果。

在光学显微镜中，用玻璃透镜来指导光子的上述行为，在电子显微镜中，则是用电磁透

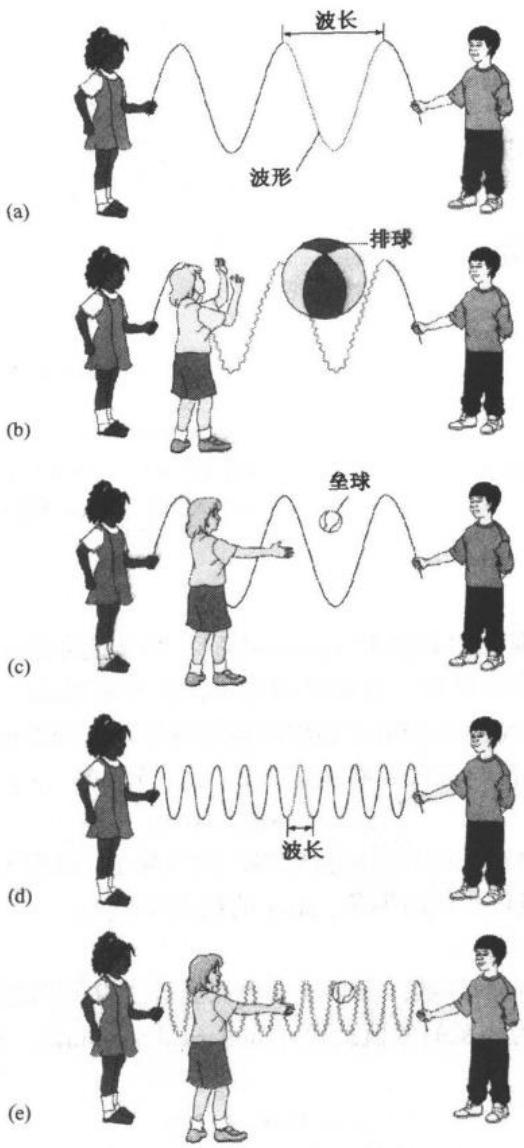


图 2-3　波的移动、波长和干扰（引自 Becker *et al*., 2000）

两个儿童共同振动一根绳子产生的波动类似于光子和电子形成的波，以此说明物体的大小对波的干扰。(a) 两个儿童振动绳子产生的特征波长；(b) 向绳子波中扔进一个球或一个物体，如果扔进物体的直径与绳子波长相近，就会干扰绳子波的移动；(c) 如果扔进一个垒球或其他比绳子波长小得多的物体，对绳子波的移动只有很小或没有干扰；(d) 如果将绳子快速振动，波长就会大大缩短；(e) 此时扔进垒球就会干扰绳子波的移动。

镜来指导电子的上述行为。这两种透镜有两个基本的共同点：焦距（focal length）和角孔径（angular aperture）。焦距是透镜的中心平面到焦点的距离（图 2-4），而角孔径是光从样品进入显微镜的物镜半角 α（图 2-5），因此角孔径实际表示有多少光离开样品通过透镜，最好的光学显微镜的角孔径大约是 70 度。

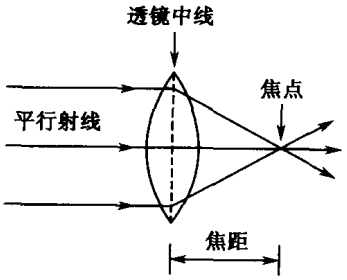


图 2-4 透镜的焦距
（引自 Kleinsmith *et al.*，1995）

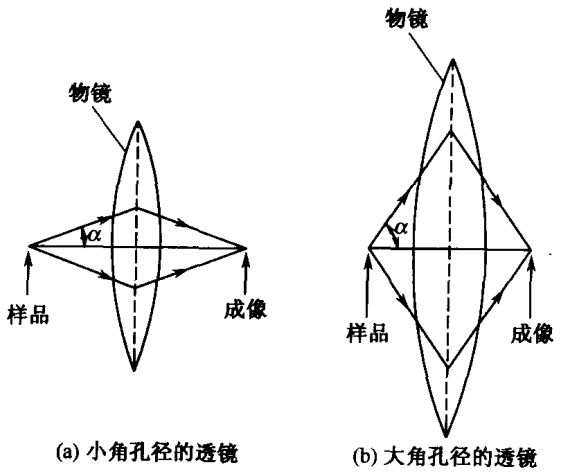


图 2-5 透镜的角孔径（引自 Kleinsmith *et al.*，1995）
角孔径是光从样品进入透镜的半角 α。(a) 小角孔径透镜；(b) 大角孔径透镜。角孔径越大，透过透镜的信息越多。

2.1.1.1 分辨率

透镜最重要的性质就是它的分辨率（resolution），是指能分辨出的相邻两个物点间最小距离的能力，这种距离称为分辨距离。分辨距离越小，分辨率越高。一般规定：显微镜或人眼在 25cm 明视距离处，能清楚地分辨被检物体细微结构最小间隔的能力，称为分辨率。人眼分辨率是 100 μm；光学显微镜的最大分辨率是 0.2 μm。分辨率（r）可用以下公式计算：

$$r = 0.61\lambda / n\sin\alpha$$

其中：n = 聚光镜和物镜之间介质的折射率，空气为 1，油为 1.5；

α = 样品对物镜角孔径的半角，$\sin\alpha$ 的最大值为 1；

λ = 照明光源的波长。

0.61 是一个恒定的参数，表示成像的点虽被重叠但仍能被区别的程度。

上式中 $n\sin\alpha$ 的量称为物镜的数值孔径（numerical aperture），缩写为 NA，因此显微镜的分辨率的表示公式可改为：

$$r = 0.61\ \lambda / \mathrm{NA}$$

各种物镜和聚光镜的数值孔径是不相同的，如干燥系物镜的 NA 为 0.05～0.95，油镜为 0.85～1.40 等。NA 被刻在物镜筒外侧和聚光镜上。

从上式可知，角孔径越大，进入物镜的光越多；介质的折射率越大，则数值孔径越大，这些都可以使分辨率提高。

2.1.1.2 最大分辨率

由于分辨率表示的是能够区别两个点间最近距离的能力，所以 r 值越小，分辨率越高。从分辨率的表达式来看，NA 越大，分辨率越高，或者波长越短，分辨率越高。

当以可见光作光源，玻璃透镜的最大分辨率是多少呢？应从以下几个方面来考虑这一问题。首先应如何尽可能地缩短波长。可见光的波长范围是 400～700nm，而可见光中的蓝色光

的波长最短，为450nm，所以光镜使用时应滤去其他杂色光。第二是使NA的数值尽可能大，因为最好的玻璃透镜的镜口角是70°，所以 $\sin\alpha$ 的最大值为0.94，空气的折光率（n）为1，因此玻璃透镜的最大数值孔径为0.94。这样，我们可以计算光镜的最大分辨率了：假定用最好的玻璃透镜，角孔径为70°，用最短的可见光——蓝色光的波长为450nm，用空气作为光的折射介质，则最大分辨率为 $r=0.61\lambda/\mathrm{NA}=0.61\times450/0.94=292\mathrm{nm}\approx0.3\mu\mathrm{m}$

光镜中的油镜可用油作为光折射的介质，由于油的折光率为1.5，所以用油镜时，分辨率 $r=0.61\lambda/\mathrm{NA}=0.61\times450/1.5\times0.94=196\mathrm{nm}\approx0.2\mu\mathrm{m}$。

在光学显微镜中，用紫外光作光源可使分辨率提高到0.1μm。紫外光的波长较短，约为200～300nm。但是，紫外光是肉眼不可见的，必须通过照相。另外，用紫外光源时需用石英透镜，价格较高。

2.1.1.3 分辨极限与放大率

一般地说，一定波长的射线不能用以探查比它本身波长短得多的结构细节，这是一切显微镜的一个基本限度。因此，光学显微镜的最高分辨极限(limit resolution)受可见光的波长(0.4～0.7μm)的限制。细菌和线粒体约0.5 μm大小，是光学显微镜能够清晰可见的最小物体；比这更小的细节，由于光的衍射效应而不能分辨。通常将光镜下所见物体的结构称为显微结构(microscopic structure)，如线粒体、中心体、核仁等可以在光镜下观察，均属于显微结构。

光并非是完全直线前进的，光波以各种稍微不同的路程通过一个光学系统，以致互相干涉产生光衍射效应。例如，用同一波长的光照射一条直边，其放大影像是一组平行线，如照射一个小圆孔，其放大影像是一组同心圆的线。同样原理，通过显微镜观察一个点，就像一个模糊的圆盘，相邻两点的像则重叠而分辨不开。对可见光来说，能清楚地分辨出相邻两点之间的最小间隔是0.2μm，称之为分辨极限。无论怎样改善透镜，也不可能克服光波本身所造成的这种限制，尽管可以将图像放大，例如投影到屏幕上，但也不可能在光镜下看清楚比0.2μm更细微的物体。

最终成像的大小与原物体大小的比值称为放大率（magnification）。总放大率 = 物镜放大率×目镜放大率，放大率同样受分辨极限的限制。一般来说，光学显微镜的最大放大率只能是透镜的数值孔径的1000倍。由于透镜的数值孔径的范围是1.0～1.4，所以光学显微镜在用空气作介质时最大放大倍数为1000倍，用油镜则为1400倍。

要提高光学显微镜的分辨率，需采取两个措施：增大角孔径或缩短波长。如果用波长比普通波长短得多的电子波代替光波，分辨率可大大提高，电子显微镜就是在这种需求下被发明的。电子显微镜的理论分辨极限为0.1～0.2nm（光学显微镜为200～300nm）。一般来说，这种理论值是难以达到的，主要限制是样品的制备和反差。表2-1是光学显微镜与电子显微镜某些特性的比较。

表2-1 电子显微镜与光学显微镜的基本区别

	分辨本领	光源	透镜	真空
光学显微镜	300 nm	可见光	玻璃透镜	不需真空
	200 nm（油镜）	可见光	玻璃透镜	不需真空
	100 nm	紫外光	石英透镜	不需真空
电子显微镜	0.1 nm	电子束	电磁透镜	真空

2.1.2 常用的光学显微镜

光学显微镜是光学显微技术的主要工具，自问世以来已有 400 多年历史。光学显微镜是利用光线照明，使微小物体形成放大影像的仪器。现今使用的光学显微镜都是由几个透镜组合而成，所以又称为复式显微镜（compound microscope）。普通复式光学显微镜的照明光源首先通过聚光镜（condenser）照射到样品，然后进入物镜形成初级镜像，最后通过目镜进一步放大成像（图 2-6）。

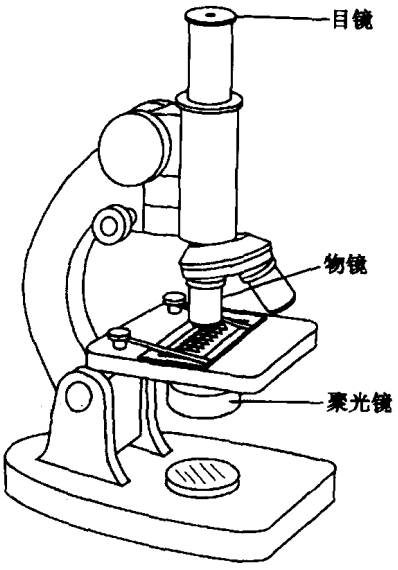


图 2-6 普通光学显微镜的基本结构

光学显微镜的种类很多，如相差显微镜、暗视野显微镜、偏光显微镜和荧光显微镜等，根据实验目的选择不同的种类。

2.1.2.1 普通双筒显微镜

比较高级的显微镜上都设有倾斜式的双目镜筒。在物镜转换器上方装有四个棱镜，使经过物镜的光线平分为两路到达目镜，故双筒显微镜（binocular microscope）的亮度要比单筒者为暗。双筒显微镜的优点为同时用两眼观察，有较强的立体感。

2.1.2.2 荧光显微镜

荧光显微镜（fluorescence microscope）以紫外线为光源照射被检物体，使之发出荧光，然后在显微镜下观察物体的形态及其所在位置。荧光显微镜可用于研究细胞内物质的吸收、运输以及化学物质的分布及定位等。

物质经过紫外线照射后发出荧光的现象可分为两种情况，第一种是自发荧光，如叶绿素、血红素等经紫外线照射后，能发出红色的荧光，称为自发荧光；第二种是诱发荧光，即物体经荧光染料染色后再通过紫外线照射发出荧光，称为诱发荧光。

荧光显微镜的工作原理是利用紫外线发生装置（如弧光灯、水银灯等）发出强烈的紫外线光源，通过照明设备把显微固定的切片或活染的细胞透视出来，基本成像原理示于图 2-7。

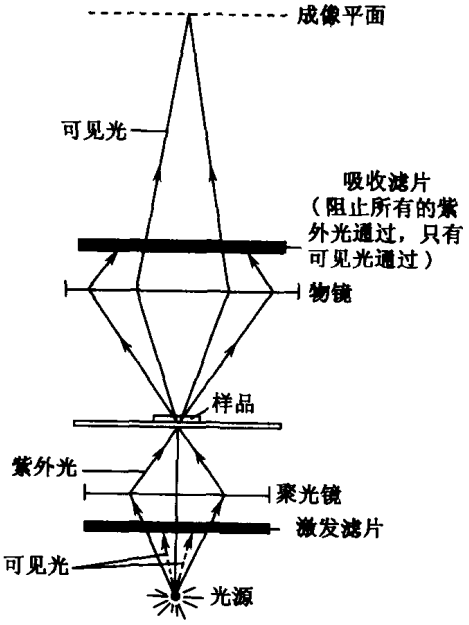


图 2-7 荧光显微镜的光通路

来自于光源的光通过紫外激发装置，紫外诱发样品上的荧光物质发射荧光，然后通过过滤板，除去紫外光，而允许发射的荧光通过，并最后成像。

2.1.2.3 相差显微镜

相差显微镜（phase contrast microscope）是荷兰科学家 Zermike 于 1935 年发明的，用于观察未染色样品。相差显微镜的优点是能观察无色、透明、活细胞中的结构。它是利用光的衍射和干涉特性使相位差变成振幅差，表现为明与暗的对比，使肉眼得以观察到无色透明物体中的细节。

相差显微镜在结构上进行了特别设计，尤其是光学系统有很大的不同（图 2-8）。

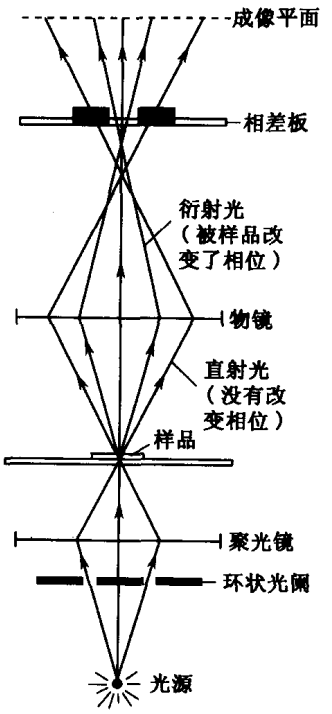


图 2-8 相差显微镜的光学部件及光线通路

小的、未经染色的样品（如活细胞）是难以用普通光学显微镜进行观察的，而相差显微镜使得高通透性的物体变得可见。在普通光学显微镜中，我们之所以能够区别一个物体的不同部分，是因为它们对光产生不同的影响，影响的根本原因就是光的衍射。细胞器是由各种不同的分子，如 DNA、RNA、蛋白质、脂、糖类、盐和水构成的，不同成分的不同部分很可能有不同的光衍射系数。在正常情况下，不同衍射系数的差异不能被我们的肉眼所区别，但是相差显微镜能够将这种衍射差异转变成明与暗的差异，这样就可以用肉眼区分了。这种转变要依靠光波的相互作用的能力即干涉（interference）。

相差显微镜具有两个其他显微镜所不具有的功能：①将直射的光（视野中背景光）与经物体衍射的光分开；②能将大约一半的波长从相位中除去，使之不能发生相互作用，从而引起强度的变化。假定将某一物体悬浮在相同的介质中，也就是说它们的各个部分的衍射系数完全相同，此时到达物体上的所有光都有一半被改变了相位，相互之间的干涉是一致的，强度的减少也是一致的（图 2-9）。

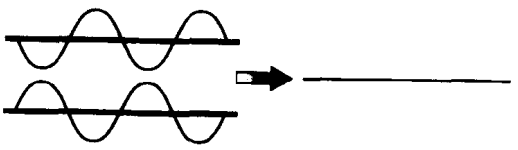


图 2-9 破坏干涉

两束光波都有一半的波长离开了相位，当这两束波相遇时，它们将形成合光，相互抵消。

为了更好地理解相差显微镜的工作原理，首先必须明白一束光是由许多单个的射线组成的。当来自于光源的射线通过样品时，它们各自的速度将会受到样品的物理性质的影响。尤其是射线衍射时，它们到达样品上的相位就会发生某种程度的改变，结果是由于相位的改变，使那些已经通过了样品的射线同那些本来就没有通过样品的射线一起离开了相位。

所谓相位是光波在前进时，电振动呈现的交替的波形变化。由于光是电磁波，其电振动与磁振动垂直，又与波的传播方向垂直，导致了传播时波形的变化。同一种光波通过折射率不同的物质时，光的相位就会发生变化，波长和振幅也会发生变化。所谓相差是指两束光波在某一位置时，由于波峰和波谷不一致，即存在着相位上的差异，叫相差。同一种光通过细胞时，由于细胞不同部分的折射率不同，通过细胞的光线比未通过细胞的光线相位落后，而

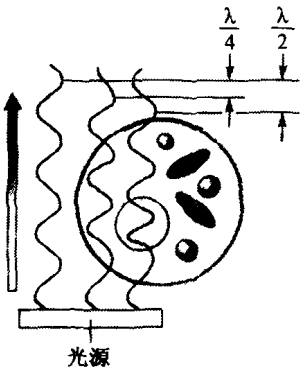


图 2-10　光线通过细胞的不同部分有不同程度的滞后（引自 Karp, 1999）
由于射线从细胞的不同部位进入，所以有不同的相位，它们同直射光的干涉，在最后成像时会产生不同程度的明与暗的差别。

通过细胞核的光线比通过细胞其他部位的相位落后（图 2-10），这就是相位差。

另外，光通过物体后形成两束光，一束直行，称为直射光，另一束斜行或绕行称为衍射光，衍射光相位落后，振幅小。两束光继续前进，当直射光和衍射光相遇时又产生干涉，此时如两者相位相同则两束光的合光振幅加大，若两者相位相反，则两束光的合光振幅减小。合光振幅大意味着物体变亮，合光振幅小则物体变暗，结果是物体在显微镜下呈现明暗对比，因而能藉以辨认无色透明物体内的细微结构。

2.1.2.4　暗视野显微镜

在日常生活中，当人的眼睛处于暗处观察光线斜射到的尘埃，由于光的反射和衍射，使尘埃颗粒似乎增大体积而可辨别。但当光线很强或有衍射存在的情况下则看不出尘埃的颗粒。根据此原理使光不直接通过样品而是斜射到样品上，即可在暗视野下观察细微粒子。

暗视野显微镜（dark field microscope）使用了一种特殊的照明方法，使光线不能直接进入物镜和目镜，这样，在观察样品时就不能直接看到照明光线，而只能观察被检物体所反射或衍射的光线，因而使被检物体在黑暗的视野中呈现明亮的像。这种照明方式，使反差增大，分辨率提高，用以观察未经染色的活体或胶体粒子（图 2-11）。

暗视野显微镜主要观察的是物体的轮廓，分辨不清内部的微细构造，适合于观察活细胞

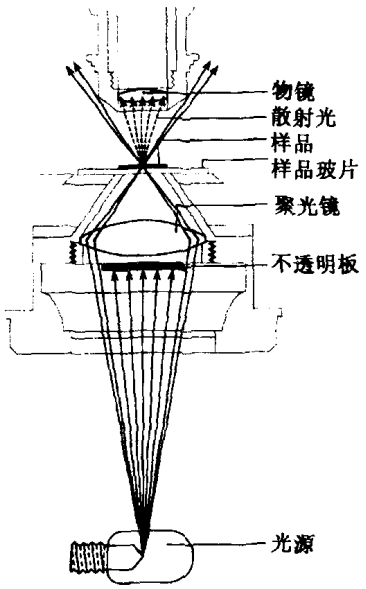


图 2-11　暗视野显微镜的光学
用一个浑浊的圆片挡住聚光器的中央，透过聚光镜的射线只能斜射到样品上，结果只有散射的射线提供镜像的信息，而背景是暗的。

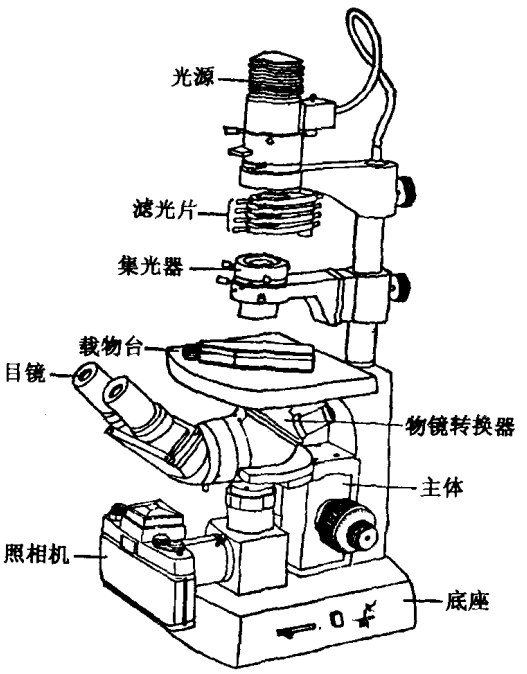


图 2-12　倒置显微镜

内的细胞核、线粒体、液体介质中的细菌和霉菌等。

2.1.2.5 倒置显微镜

倒置显微镜的结构组成与普通显微镜一样，所不同的只是它的物镜与照明系统的位置颠倒过来。前者置于载物台之下，而后者在载物台的上方。集光器与载物台之间的工作距离提高，可以放置培养皿、培养瓶等容器，直接对培养的细胞进行照明和观察（图 2-12）

2.1.3 光学显微镜的样品制备

光学显微镜的实用性强，大多数样品都可用光学显微镜进行观察。样品可以粗略的分为两类：整体和切片。细菌、原生动物等可以直接制备成样品进行整体显微观察；对于动植物组织可以制成切片进行显微观察。

由于大多数细胞的成分不影响光线的穿透，无法形成反差，所以在一般光学显微镜下，几乎看不清未经处理的细胞。为了看清细胞内含物，就必须对细胞样品进行一些特殊的处理，为此建立和发展了样品的各种制备技术。

2.1.3.1 样品的固定

样品处理的第一步通常是进行初固定（primary fixation）。生物组织在染色前先进行固定的目的是杀死细胞，稳定细胞的化学成分，并且使样品硬化以便在进一步的处理和切片时不会受到破坏。样品固定的最简单做法是将样品直接浸泡在固定液中。固定使得大分子交联而保持在一定的位置上，不至于在以后的染色等处理过程中移位或丢失而产生人工假象。一般用具有缓冲作用的醛类固定液，用甲醛或戊二醛作固定剂，能够与蛋白质的游离氨基形成共价键，从而将邻近的蛋白质分子牢固地交联在一起。

2.1.3.2 包埋和切片

样品制备的第二步是将固定的组织制备成切片。为此，样品首先要被包埋（embedding）在介质中，通常用液态的石蜡或树脂做包埋剂，使之渗入整块组织，然后将之硬化成固体的包埋块，随后用专门的切片机切割包埋块，制备成薄切片（图 2-13）。适用于光学显微镜观察的切片厚度为 1～10 μm。

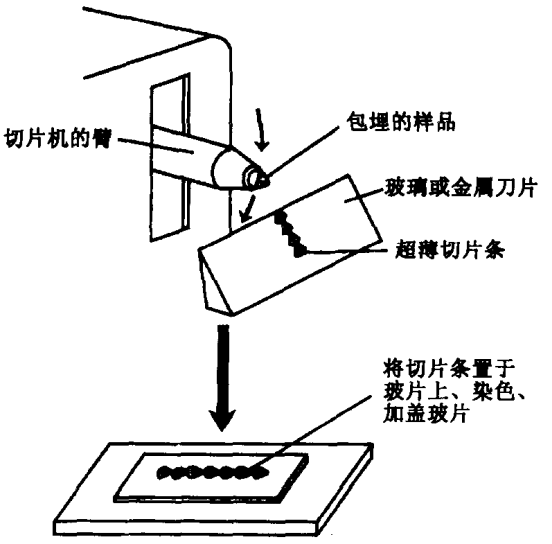


图 2-13 用切片机进行样品切片

将固定的样品包埋之后，固定在切片机的臂上，当切片机的臂通过一个环形的弧光刀，就会将样品切成切片。这些切片互相黏在一起，形成橡皮条状，然后可以固定在玻片上，进行染色并加上盖玻片保护起来。

2.1.3.3 染色

大多数细胞总重量的 70% 是水，对可见

光几乎是透明的，只有很少的内含物不透光。染色（staining）的目的就是给细胞的不同组分带上可区别的颜色特征。19 世纪初，发现某些有机染料可染生物组织，并对细胞特殊部位的着色具有选择性。如苏木精（hematoxylin）对负电荷分子有亲和性，能显示出细胞内核酸的分布；酸性染料如伊红（eosin）可使细胞质染色；苏丹染料（Sudan dyes）在脂肪中的溶解度比在乙醇中大，所以苏丹染料的乙醇饱和溶液能使脂肪着色。但对许多染料的特异性染色机制尚不清楚。

2.1.3.4 放射自显影

放射自显影（autoradiography）技术是用感光胶片测定细胞内某种被放射性标记的物质在细胞固定时所在的位置，基本过程如图 2-14 所示。

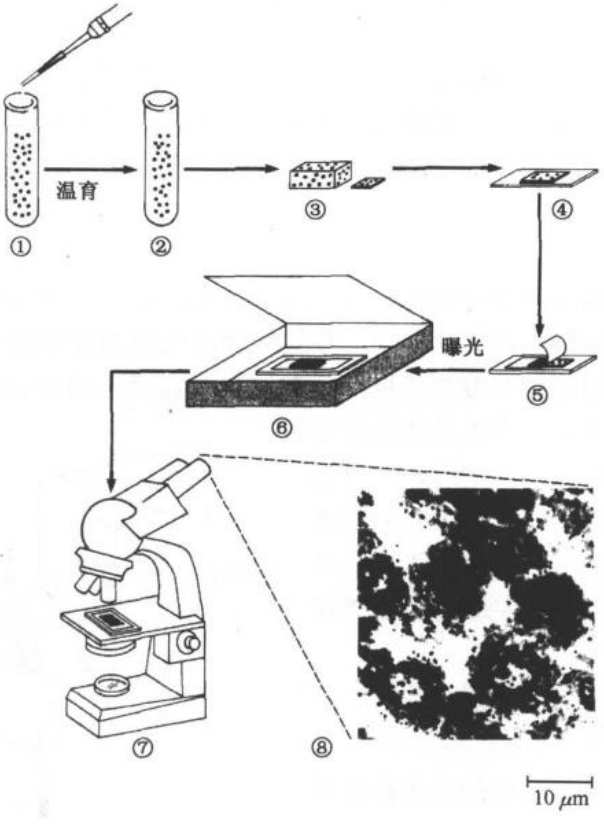


图 2-14 放射自显影术（引自 Becker *et al*., 2000）

放射自显影的基本过程包括：①将细胞、组织或器官悬浮在含放射性标记的液体中，然后温育一段时间；②停止温育，将生物材料进行洗涤，固定，并同液体分开；③将固定的样品进行包埋和切片；④将切片进行洗涤，然后放置在载玻片上，⑤在玻片上加一层照相乳胶（全过程都应在暗室中进行）；⑥将玻片放在一密闭的盒子中，放适当的时间，让细胞中的放射性直接曝光于照相胶片上；⑦将玻片进行显影、洗涤和固定，然后水洗，并在显微镜下进行检查；⑧图中显示的是用^{3}H 标记的 RNA 前体物，胞嘧啶核苷注射大鼠 12 小时后的肝细胞放射自显影结果。

放射自显影的原理是利用放射性同位素所发射出来的带电离子（α 或 β 粒子）作用于感光材料的卤化银晶体，从而产生潜影，这种潜影可用显影液显示，成为可见的“像”，因此，

它是利用卤化银乳胶显像检查和测量放射性的一种方法。

放射性同位素的原子不断衰变，当衰变掉一半时所需要的时间称为半衰期。各种放射性同位素的半衰期长短不同，在自显影实验中多选用半衰期较长者。对于半衰期较短的同位素，应选用较快的样品制备方法，所用剂量也应加大。

放射自显影实验中常用的放射性同位素的半衰期和能量见表 2-2。

表 2-2　自显影实验中常用同位素的半衰期与能量

名称	半衰期	粒子类型	能量/MeV	名称	半衰期	粒子类型	能量/MeV
^{3}H	12.3 a	β	0.018	^{45}Ca	152 d	β	0.26
^{11}C	20 min	β	0.981	^{59}Fe	45 d	β	0.46
^{14}C	5700 a	β	0.155			γ	1.30
^{32}P	14.3 d	β	1.71	^{60}Co	5.3 a	β	0.308
^{35}S	87.2 d	β	0.167	^{64}Cu	12.8 h	β	0.657
^{131}I	8.0 d	β	0.25			γ	1.35

2.1.4　电子显微镜

光学显微镜的分辨率主要是受照明光线的波长限制，在可见光源下无法分辨小于 0.2μm 的细微结构，即使改用紫外光源，分辨率也只能是 0.1μm。提高分辨率的最好办法就是缩短照明光源的波长，这导致了电子显微镜（electron microscope）的发明。光源与分辨率的关系同样适于电子束，由于电子束的波长比光的波长短 100 000倍，因而用电子束代替光波，可大大提高显微镜的分辨率。1932 年德国学者 Knolls 和 Ruska 发明了第一台电子显微镜，开拓了超微世界，发现了许多光镜下看不到的结构，如细胞膜、线粒体、细胞核、高尔基体、中心粒等细胞器的细微结构。将在光学显微镜中观察不到而只能在电子显微镜下观察的结构称为亚显微结构（submicroscope structure），或超微结构（ultrastructure）。电子显微镜与光学显微镜在总体结构的设计上有很大的差别（图 2-15）。在种类上，电镜可分为两大类：透射电子显微镜和扫描电子显微镜。还有在这两类电子显微镜的基础上发展起来的具有特别功能的电子显微镜，如透射扫描电子显微镜、免疫电子显微镜、高压电子显微镜等。

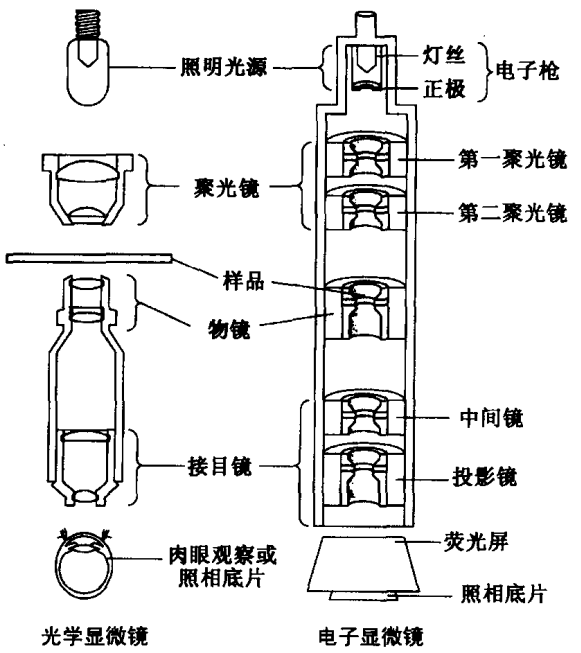


图 2-15　光镜与电子显微镜（透射电镜）的结构

2.1.4.1 透射电子显微镜

透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM)主要是让电子束穿透样片而成像。电子显微镜基本结构由3大部分组成:电子光学系统(镜筒)、真空系统、电子学系统(供电系统)。电子光学系统由照明系统、样品室、成像系统、观察窗和记录用的照相机等组成。由于电子显微镜必须在高度真空条件下进行工作,阴极与阳极之间会放电,灯丝也会因受氧化或被阳离子轰击而缩短寿命,所以设计了真空系统。电子学系统即供电系统,需要高压稳压。

真空系统(vacuum system)　由于电子在空气中行进的速度很慢,所以必须由真空系统保持电镜的真空度,否则,空气中的分子会阻挠电子束的发射而不能成像。用两种类型的真空泵串连起来获得电子显微镜镜筒中的真空,当电子显微镜启动时,第一级旋转式真空泵(rotary pump)获得低真空,作为二级泵的预真空;第二级采用油扩散泵(oil diffusion pump)获得高真空。

电子枪(electron gun)　电子枪是电子显微镜的照明源,主要由灯丝阴极(cathode)、阳极(anode)组成,在阴极灯丝与阳极之间有一个韦氏圆筒(Wehnelt cylinder),控制电子束的形状和发射强度。灯丝的阴极类似于灯泡的灯丝,当它发热时,可以从表面发射电子。在灯丝的下方有一个阳极,用来加速电子,阴极的电压一般为50～100kV,而阳极的电压为0V,两极的电压差异称为加速电压(accelerating voltage),当电子通过圆筒时,可引起加速。

电磁透镜(electromagnetic lens)　电子显微镜的成像主要是依靠电子既像波又似粒子的性质,玻璃透镜能够使光射线弯曲穿过,电磁透镜则能控制电子的轨道,因为电子是带电的,所以电磁透镜能够改变电子束的方向。在透射电子显微镜中有5个电磁透镜:第一和第二聚光镜、中间镜、投射镜和物镜。聚光镜(condenser lens)的作用就是将来自电子枪的电子汇聚到样品上,通过它来控制照明电子束斑的大小。一般采用亮光聚光镜,以便达到最好的效果。第一聚光镜是强透镜,它的作用是缩小束斑直径,最小可达1～2μm。第二聚光镜是弱透镜,作用是控制照明亮度、照明角孔径和照明斑的大小。物镜(objective lens)是电子显微镜最重要的部件,由它获得电子放大像。中间镜(intermediate lens)的作用是把物镜形成的一级放大像投射到透射镜上,而投射镜(projector lens)的作用是把中间镜形成的二级放大像投射到荧光屏上,从而形成终像。

照相系统(photographic system)　在投射镜下面是像的观察和记录系统。用荧光屏观察终像,用照相系统记录终像。

2.1.4.2 扫描电子显微镜

扫描电子显微镜使用与透射电子显微镜完全不同的方式成像,即用电视的方式成像。扫描电子显微镜是1965年发明的较现代的细胞生物学研究工具,主要用于观察样品的表面结构。

扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM)主要是利用二次电子信号成像来观察样品的表面形态,即用极狭窄的电子束去扫描样品,通过电子束与样品的相互作用产生各种效应,其中主要是样品的二次电子发射。二次电子能够产生样品表面放大的形貌像,这种像是在样品被扫描时按时序建立起来的,即使用逐点成像的方法获得放大像。扫描电子显微镜主要由电子光学系统和显示单元组成,它的光学系统结构示于图2-16。

扫描电子显微镜的真空系统和电子源与透射电子显微镜基本相似，但它的加速电压较低（只有 5～30kV）。这两类电子显微镜间的主要差别是成像原理不同。扫描电子显微镜用电子枪产生电子射线，经过聚光镜的电子聚焦，形成狭窄的电子束射到样品的表面，与此同时，位于聚光镜和物镜之间的偏转线圈（beam deflector）使电子束在样品上作快速扫描，并同时将扫描信号传递到扫描器和显像管。当电子束在样品表面作快速扫描时，样品中的分子被激发成高能状态，使原子外层的电子发射出来，即二次电子（secondary electron）。二次电子数量的多寡与样品材料的性质、样品表面的高低、凹凸有关。二次电子很快被上方的闪烁检测器（scintillator）捕获，当闪烁检测器结合电子后会发射出光质子，这些质子可用于产生电信号传递给显像管。由于显像管的荧光屏上的画面与样品被电子束照射面严格同步扫描，逐点逐行一一对应，所以样品任何一点上的二次电子发射强度的任何变化都会表现为荧光屏上对应点的亮度的变化，因而能反映样品表面的形态。

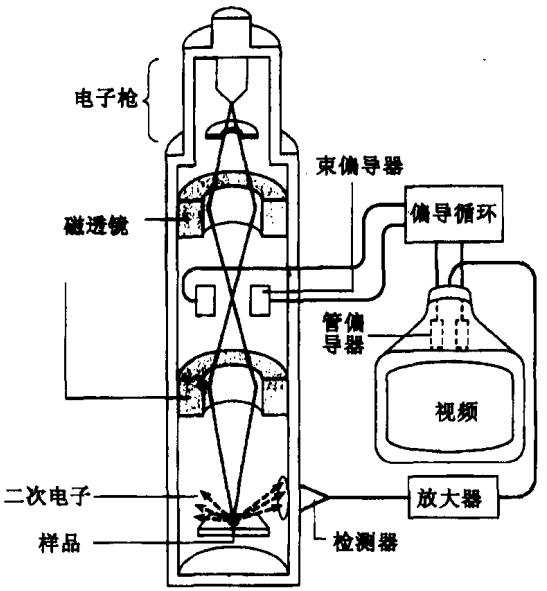


图 2-16　扫描电子显微镜的光学系统

2.1.4.3　扫描透射电镜与高压电镜

扫描透射电子显微镜（scanning transmission electron microscope，STEM）既有透射电子

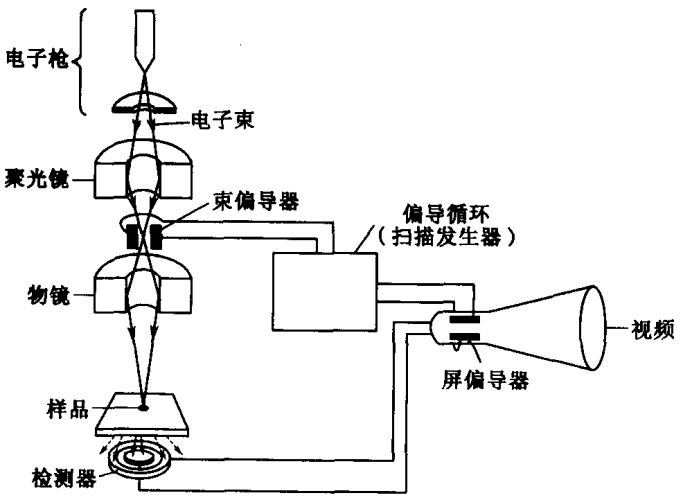


图 2-17　扫描透射电子显微镜

STEM 用磁透镜将电子束聚焦到样品并在样品表面快速扫描。但是，并不是依靠二次电子成像，而是靠一级电子穿透样品成像。

显微镜的功能又有扫描电子显微镜的功能（图 2-17）。像 SEM 一样，STEM 用电子束在样品的表面扫描，但又像 TEM，通过电子穿透样品成像。STEM 能够获得 TEM 所不能获得的一些关于样品的特殊信息。STEM 技术要求较高，要非常高的真空度，并且电子学系统比 TEM 和 SEM 都要复杂。

高压电子显微镜（high-voltage electron microscope，HVEM）同透射电子显微镜基本相同，只是电压特别高。TEM 使用的加速电压是 50～100kV，而 HVEM 使用的电压是 200～1000kV。由于电压高，就会大大减少造成染色体畸变的可能，因此，可以用较厚的细胞切片研究细胞的结构，切片的厚度最大可达 1μm，相当于普通 TEM 样品厚度的 10 倍。

2.1.5 电子显微镜的样品制备

如同光学显微镜，电子显微镜的样品也需固定、包埋、切片、染色等。用于电子显微镜的组织固定比光镜的要求更高（图 2-18）。首先是样品要薄，这是因为电子的穿透能力十分有限，即使是 100～200kV 高压，电子穿透厚度仅为 1μm。通常把样品制成 50～100nm 厚的薄片（一个细胞切成 100～200 片），称超薄切片（ultrathin section）。其次是要求很好地保持样品的精细结构，特别是在组织固定时要求既要终止细胞生命，又不破坏细胞的结构。第三是要求样品要具有一定的反差。电子显微镜的样品切片最后被放置在载网上而不是玻片上。

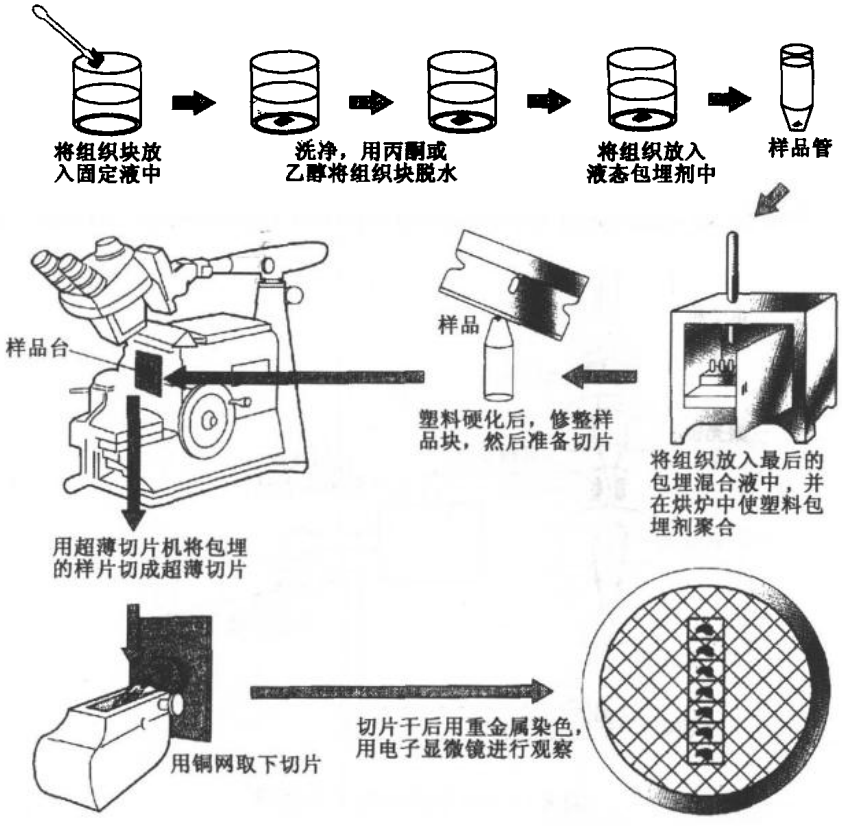


图 2-18 电子显微镜样品的制备过程（引自 Karp，1999）

2.1.5.1 负染色

电子显微镜可用于检查很小的颗粒物质，包括高分子质量的聚合体，如病毒、核糖体、多亚基的酶、细胞骨架以及蛋白质复合体等。只要有足够的反差，也可在电子显微镜下观察蛋白质和核酸分子。

用重金属盐（如磷钨酸钠、醋酸铀等）对铺展在载网上的样品进行染色，使整个载网都铺上一层重金属盐，而有凸出颗粒的地方则没有染料沉积。由于电子密度高的重金属盐包埋了样品中低电子密度的背景，增强了背景散射电子的能力以提高反差。这样，在图像中背景是黑暗的，而未被包埋的样品颗粒则透明光亮，这种染色称为负染色（negative stainning）。负染色是只染背景而不染样品，与光学显微镜样品的染色正好相反。一些生物大分子组成的结构，如病毒、线粒体基粒、核糖体和蛋白质组成的纤维等可以通过负染色电镜技术观察其精细结构，还可以从不同角度观察三维结构。

2.1.5.2 喷镀技术

喷镀（shadow casting）技术是电子显微镜中一种重要的增强背景和待观察样品反差的方法（图 2-19）。由于喷镀时要求有一定的角度，朝向加热丝的一面被金属覆盖，而背向加热丝的样品面和背景则不能被金属覆盖。结果，在电子显微镜下观察时，被金属覆盖的很暗，而未被覆盖的则光亮。

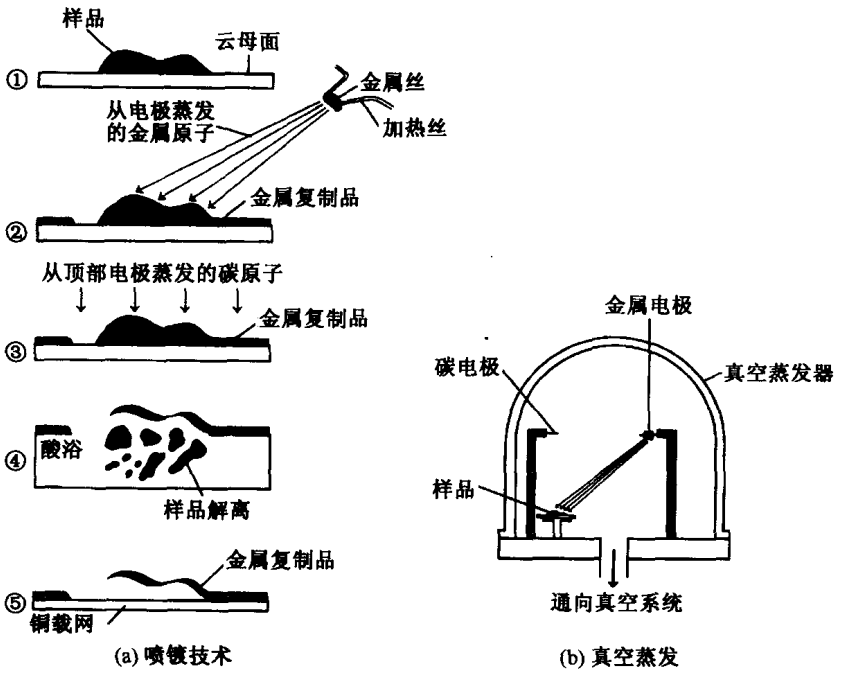


图 2-19 喷镀技术（引自 Becker *et al*., 2000）

(a) 喷镀的基本过程。①将样品置于云母的表面，然后干燥；②在真空装置中将样品镀上一层重金属（金或铂金），喷镀时的加热丝具有一定的角度；③将样品镀上一层碳原子，以增加喷镀强度和稳定性；④将喷镀后的样品置于酸池中，破坏样品，只留下金属复制品；⑤漂洗后置于载网上进行电子显微镜观察。(b) 喷镀的真空装置。

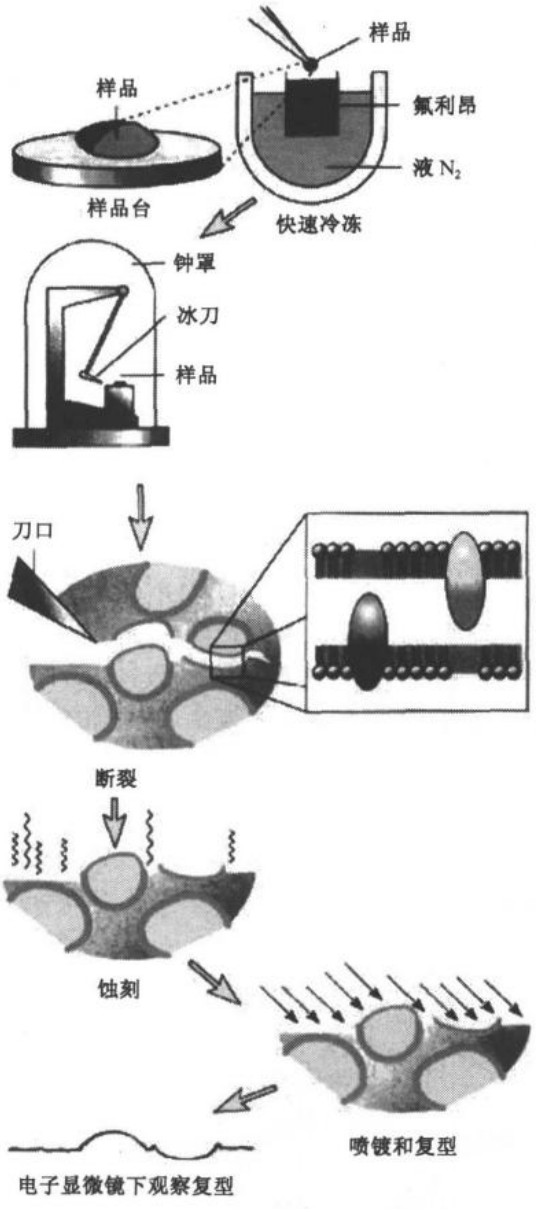


图 2-20　冷冻断裂与冷冻蚀刻技术（引自 Karp，1999）

2.1.5.3　冷冻断裂复型和冷冻蚀刻

是专门观察样品外表面的投影复型术。冷冻断裂复型（freeze-fracture replication）技术是先将生物样品在液氮中（－196℃）进行快速冷冻，防止形成冰晶。然后将冷冻的样品迅速转移到冷冻装置中，并迅速抽成真空。在真空条件下，用冰刀横切冷冻样品，使样品的内层被分开露出两个表面。如用冰刀切开细胞膜时，分开的两个面分别称为 P 面（protoplasmic face）和 E 面（exoplasmic face），P 面是靠近细胞质一面的半层膜，而 E 面则是靠近细胞外基质面的半层膜，可清楚地观察到镶嵌蛋白。

冷冻蚀刻（freeze-etching）技术是在冷冻断裂技术的基础上发展起来的更复杂的复型技术。如果将冷冻断裂的样品的温度稍微升高，让样品中的冰在真空中升华，而在表面上浮雕出细胞膜的超微结构。当大量的冰升华之后，对浮雕表面进行铂-碳复型，并在腐蚀性溶液中除去生物材料，复型经重蒸水多次清洗后，捞在载网上作电镜观察（图 2-20）。

除了上面介绍的几种常用的电镜样品的制备方法外，还有电镜的放射自显影术，它同光学显微镜的放射自显影技术基本相同，主要差别是光学显微镜的放射性样品放置在玻片上，而电镜的放射性样品是放置在载网上。

2.1.6　间接成像技术

光学显微镜和电子显微镜是利用质子和电子使样品直接成像的技术，还有一些显微方法是间接成像。所谓间接成像，举一个例子，假定你拿起一个物体，非常靠近你的眼睛进行观察，你或许觉得该物体有 6 个平面、12 条边和 8 个角，然后将你感觉到的画出来，可能是一个盒子，这就是间接成像。下面讨论的是几种间接成像的方法，这些方法都具有原子级分辨力，它们的分辨率比最好的电子显微镜还高 10 倍。虽然这些方法目前都存在一定的缺陷限制其在生物学中的应用，但具有发展潜力。

2.1.6.1 扫描隧道显微镜

扫描隧道显微镜（scanning tunneling microscope，STM）由 IBM 公司瑞士苏黎世研究所的两位学者 Binning 和 Rohrer 等在 1981 年发明的具有原子显像力的显微镜，是根据量子力学中的隧道效应原理而制成的。这种显微镜对生物学、物理学、化学等学科均有推动作用，可用于研究表面的原子结构和电子结构，故于 1986 年获得了诺贝尔物理学奖。

基本原理

与扫描显微镜完全不同的是，扫描隧道显微镜不是用电子束而是用扫描探针对样品表面进行扫描。这一装置是根据量子力学中隧道效应设计的，扫描探针是其关键部件。针尖直径为 1Å，探针是由钨丝或铂铱丝制成。把探针与被测样品表面作为两个电极或两个导体，将探针逐步迫近被测样品，使两者的距离达到数 Å。可导致它们表面的电子云发生重叠，此时在两者间加上一微小电压（2mV～2V），电子就可因量子隧道效应由针尖（或样品）移到样品（或针尖），从而在样品和针尖之间产生电流——隧道电流，这种隧道电流对针尖与样品表面间的距离变化特别敏感：二者的间距减小 0.1nm 时，电流可增大一个数量级；二者的间距稍增大时、电流就大为减小，电流与两电极的距离呈指数关系变化。如果控制针尖和样品之间的距离和保持隧道电流的稳定，进行针尖在样品表面的扫描，探针在垂直于样品方向上高低的变化，反映出样品表面的起伏，可以获得表面电子态和化学特性的有关信息，把针尖在样品表面扫描的轨迹显示在荧光屏上就得出样品表面的原子排列图像（图 2-21）。STM 可用于表面结构分析、表面电子态和化学特性分析。

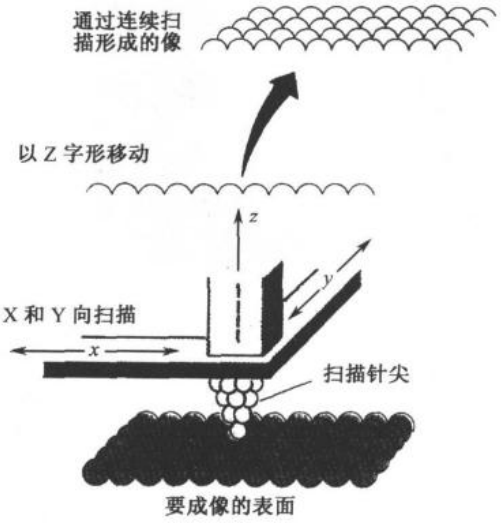


图 2-21 扫描隧道显微镜

（引自 Becker *et al.*，2000）

扫描隧道显微镜使用电子学的方法，用一个金属针尖在样品表面扫描。图中所画的是一个球状，实际上是由一个或几个原子构成的尖。针尖和样品表面之间会产生电压。当针尖沿 X 和 Y 方向在样品表面扫描时，就会在针尖和样品表面第一层电子之间产生电子隧道。该显微镜设计的沿 Z 字形扫描，可保持电流的恒定。因此，针尖的移动是隧道电流的作用，并且可以反映在荧光屏上。连续的扫描可以建立起原子级分辨率的表面像。

扫描隧道显微镜的特点

与电子显微镜或 X 射线衍射技术研究生物体结构相比，扫描隧道显微镜具有以下特点：

a. 高分辨率。扫描隧道显微镜具有原子级的空间分辨率，其横向空间分辨率为 1Å，纵向分辨率达 0.1Å。

b. 扫描隧道显微镜可直接探测样品的表面结构，可绘出立体三维结构图像。

c. 扫描隧道显微镜可在真空、常压、空气，甚至溶液中探测物质的结构。由于没有高能电子束，对表面没有破坏作用（如辐射、热损伤等），所以能对生理状态下生物大分子和活细胞膜表面的结构进行研究，样品不会受到损伤而保持完好。

d. 扫描隧道显微镜的扫描速度快，获取数据的时间短，成像也快，有可能开展生命过程

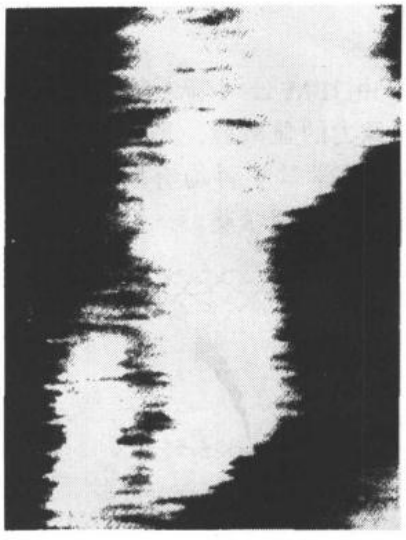


图 2-22　扫描隧道显微镜观察的 DNA 双螺旋结构（引自 Kleinsmith *et al*.，1995）

的动力学研究。

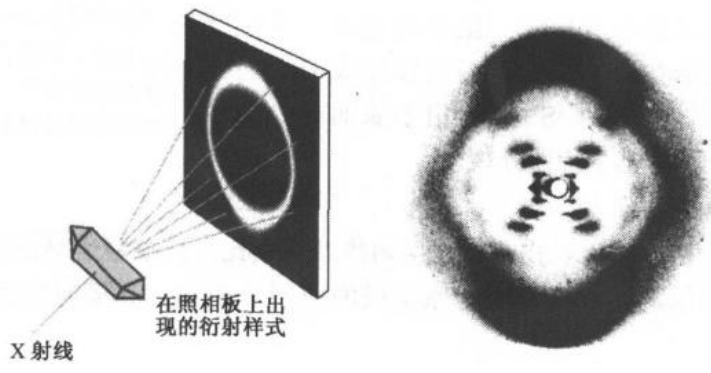
e. 不需任何透镜，体积小，携带方便。

DNA 双螺旋结构的建立是根据 X 射线衍射结果推导出来的，至今还没有直接观察 DNA 结构的方法，所以对其中的细微结构还不够了解。用 STM 研究了 DNA 的双螺旋结构，观察到 DNA 分子上的大沟（major groove）和小沟（minor groove），并且了解 DNA 的结构随染色体长度而异（图 2-22）。这对了解基因的定位和调控是很重要的。STM 也用于研究大肠杆菌质粒中环状 DNA 的结构。对以上两种 DNA 的结构均能在溶液中进行研究，接近生理条件，反映 DNA 的自然结构状态。

此外还可用 STM 研究胶原、纤维和其他蛋白质结构，也可用于细胞膜表面结构的研究。但是，由于扫描隧道显微镜检查的对象必须是导电体，而生物样品的导电性很差，这是限制扫描隧道显微镜在生命科学研究中应用的主要因素。

2.1.6.2　原子力显微镜

原子力显微镜（atomic force microscope，AFM）是 Binning 在 STM 的基础上发展起来的一种显微镜。这种显微镜的一个重要改进就是不再要求样品是导电体，也就是可用于检查不导电的样品的形貌并能得到清楚的图像。但是，AFM 的分辨率比 STM 要低。AFM 之所以能够检查非导电的样品，是因为针尖被安装在灵敏的悬臂上，当针尖原子与样品表面原子之间的原子力发生变化时，便牵动悬臂使之发生相应的偏移，通过激光可以测出这种原子力的变化，并可同时扫描出原子水平的结构图像。



(a) 晶体 DNA 通过 X 射线衍射在照相板上出现的衍射样式　　(b) X 射线衍射数学分析结果

图 2-23　DNA 分子结构 X 射线衍射分析（引自 Kleinsmith *et al*.，1995）

用结晶图像分析接近原子分辨率的分子结构。(a) 用 X 射线对 DNA 晶体分子进行衍射；(b) 照相记录衍射结果，然后进行结构分析。

2.1.6.3 X射线衍射

X射线衍射(X-ray diffraction)技术并不涉及显微镜，但是能够根据X射线通过结晶样品形成的衍射样式成像。这一技术可用于在原子分辨的水平上推测分子的结构。实际上X射线衍射技术是目前在原子水平上分析蛋白质、核酸和其他生物分子的惟一方法。Watson和Crick提出DNA双螺旋结构模型的主要依据之一就是根据Franklin对DNA晶体衍射的结果(图2-23)。

2.2 细胞化学技术

细胞生物学的一个主要特点是将细胞形态观察与细胞成分分析结合起来，其中一个重要的研究手段就是细胞化学（cytochemistry）技术。细胞化学技术不是单一的技术，而是一整套有关联的技术，包括酶细胞化学技术、免疫细胞化学技术、放射自显影技术、示踪细胞化学技术等。

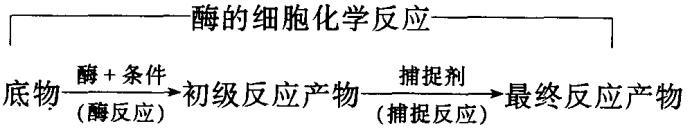
2.2.1 酶细胞化学技术

酶细胞化学（enzyme cytochemistry）技术就是通过酶的特异细胞化学反应来显示酶在细胞内的定位。由于酶的细胞化学定位对研究细胞的生理功能和病理过程具有重要作用，而且很多酶可以作为细胞膜和各种细胞器的标志酶，这为研究细胞器的结构与功能、细胞器的相互关系以及细胞的鉴别等提供有力的手段，这一技术越来越受到重视。

2.2.1.1 基本原理

将细胞内的酶与底物相互作用，再将酶反应的产物作为反应物质，在酶的作用部位进行捕捉，使其在显微镜下具有可见性。这种在酶作用下产生的反应产物，经捕捉反应来间接证明酶定位的反应称为酶的细胞化学反应。

由此可见，酶的细胞化学反应包括两个反应：第一反应是酶作用于底物的反应，称酶反应，形成的产物称为初级反应产物；第二反应是捕捉剂与初级反应产物的作用，称捕捉反应，产生最终反应产物：

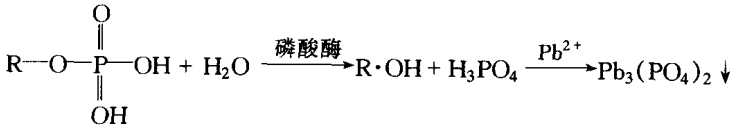


2.2.1.2 特异性

设计酶的细胞化学反应，最重要的是找到酶的特异性反应底物。一般，酶只作用于特异的底物，称酶的底物特异性，它是酶反应的基础。但是，也有不同酶作用于同一种底物的现象，这给酶细胞化学研究带来了困难。为获得特异性的酶反应，通常采用酶抑制剂来抑制不需要酶的活性，如在腺苷酸环化酶的细胞化学反应中，以ATP为底物时，加入氟化钠可以抑制ATP酶的活性，同时又可激活腺苷酸环化酶。另外可通过寻找新的作用底物来增加酶反应的特异性。

2.2.1.3 捕捉反应

捕捉反应的目的是形成显微镜下可见的最终反应产物。在光学显微镜酶细胞化学反应中，反应的最终产物是有色沉淀。具体捕捉反应的方法很多，如金属盐沉淀法、色素沉淀法。在电镜酶细胞化学反应中，最终反应产物是形成高电子密度的沉淀，常用的捕捉反应方法是金属盐沉淀法和嗜锇性物质生成法。例如磷酸酶是一类水解酶，能催化磷酸酯水解。在磷酸酶的细胞化学反应中，酶作用于底物所产生的初级产物是磷酸，可用铅作捕捉剂形成具有高电子密度的沉淀：



2.2.2 免疫细胞化学技术

免疫细胞化学（immunocytochemistry）技术是利用免疫反应定位组织或细胞中抗原成分分布的一类技术。主要分为两大类：免疫荧光（immunofluorescence）技术和免疫电镜（immunoelectron microscopy）技术。

2.2.2.1 免疫荧光技术

将免疫学方法（抗原抗体特异结合）与荧光标记技术结合起来研究特异蛋白抗原在细胞内分布的方法。由于荧光素所发的荧光可在荧光显微镜下检出，从而可对抗原进行细胞定位。

2.2.2.2 免疫电镜

如同荧光显微镜一样，可以采用一些特殊技术增强电子显微镜样品反差，从而进行亚细胞结构和分子的定位。可以用电子显微镜观察免疫反应的结果，前提是将抗体进行特殊标记。根据标记方法的不同，分为免疫铁蛋白技术、免疫酶标技术和免疫胶体金技术。如免疫铁蛋白技术是将含铁蛋白通过一种低分子质量的双功能试剂与抗体结合，成为一种双分子复合物，它既保留抗体的免疫活性，又具有电镜下可见的高电子密度铁离子核心，因此用铁蛋白标记的抗体可通过电镜免疫化学的方法在电镜下定位细胞中的抗原。由于某些固定技术（如锇酸固定）对抗体抗原的结合有干扰，因此应采取较为温和的样品制备方法。

2.2.3 其他细胞化学技术

除了上面介绍的细胞化学分析技术外，还有许多细胞化学的定量和定性分析技术。

2.2.3.1 显微分光光度术

将显微镜技术与分光光度计结合起来的技术称显微分光光度术(microspectrophotometry)。它以物质分子的光吸收、荧光发射和光反射特性作为测定基础，可用来分析生物样品细微结

构中的化学成分，同时进行定位、定性和定量。

2.2.3.2 显微荧光光度术

利用显微分光光度计对细胞内原有能发光的物质或对细胞内各种化学成分用荧光探针标记后进行定位、定性和定量地测定，称为显微荧光光度术（microfluorometry），也称细胞荧光光度术（cytofluorometry）。它是一种微观而灵敏的方法，对于研究细胞的结构、功能及其变化具有重要意义。

2.2.3.3 核磁共振技术

核磁共振（nuclear magnetic resonance，NMR）技术可以直接研究溶液和活细胞中小分子质量（20kDa 以下）的蛋白质、核酸以及其他分子的结构，而不损伤细胞。其基本原理是：原子核有自旋运动，在恒定的磁场中，自旋的原子核将绕外加磁场作旋转运动，叫进动（precession）。进动有一定的频率，它与所加磁场的强度成正比。如在此基础上再加一个固定频率的电磁波，并调节外加磁场的强度，使进动频率与电磁波频率相同。这时原子核进动与电磁波产生共振，叫核磁共振。核磁共振时，原子核吸收电磁波的能量，记录下的吸收曲线就是核磁共振谱（NMR-spectrum）。由于不同分子中原子核的化学环境不同，将会有不同的共振频率，产生不同的共振谱。记录这种波谱即可判断该原子在分子中所处的位置及相对数目，用以进行定量分析及分子质量的测定，并对有机化合物进行结构分析。

2.3 细胞分选技术

细胞分选（cell sorting）技术是细胞生物学研究中一个全新的技术领域，主要用流式细胞仪（flow cytometer，FCM）对细胞或染色体进行分选，并对单个细胞或其他生物微粒进行定量分析，包括测量细胞的大小、形状、细胞 DNA、RNA 含量和细胞总蛋白等。

2.3.1 流式细胞仪的基本结构

流式细胞仪主要由以下几部分组成。

激光光源：可发出合适波长的光。

流室（flow chamber）：生物颗粒在此与鞘液（sheath fluid）相混。鞘液包裹着细胞的液滴经喷嘴（tip）流出，当液滴下流至适当位置，受激光照射可发射出不同的光讯号。

讯号检测器（detector）：由光学透镜装置和光电倍增管组成，接收放大各种光讯号，并把它们转变成电脉冲讯号。

讯号分析部件：为微型电子计算机装置，对讯号做出分析。

2.3.2 细胞分选

细胞分选中所用的标记细胞的探针是能够同待分选细胞表面特征性蛋白（抗原）结合的

抗体，而这种抗体又能够同某种荧光染料结合。当结合有荧光染料的探针与细胞群温育时，探针就会同具有特异表面抗原的细胞紧紧结合，由于抗体的结合，被结合的细胞带上了荧光标记。细胞被标记之后，除去游离的抗体，并将细胞进行稀释。当稀释的细胞进入超声波振荡器时，极稀的细胞悬浮液形成很小的液滴，一个液滴中只含有一个细胞。液滴一旦形成并通过激光束时，激光束激发结合在细胞表面抗体分子成为一种标签。当液滴逐个通过激光束时，受到两种检测器的检测：如果液滴中含有细胞就会激活干涉检测器（interference detector），只有带有荧光标记细胞的液滴才会激活荧光检测器（fluorescence detector）。当带有荧光标记的液滴通过激光束时，将两种检测器同时激活，引起液滴充电信号使鞘液带上负电荷。由于液滴带有负电荷，移动时就会向正极移动，进入到荧光标记细胞收集器中。如果是含有非荧光标记细胞的液滴进入激光束，只会被干涉检测器检测到，结果使充电信号将液滴的鞘液带上正电荷，从而在移动时偏向负极，被非荧光标记细胞收集器所收集。如果是不含有细胞的液滴进入激光束，则不会被任何检测器所检测，因而不会产生充电信号，液滴的鞘液不会带上任何电荷，所以在移动时不受任何影响直接进入非检测的收集器（图 2-24）。

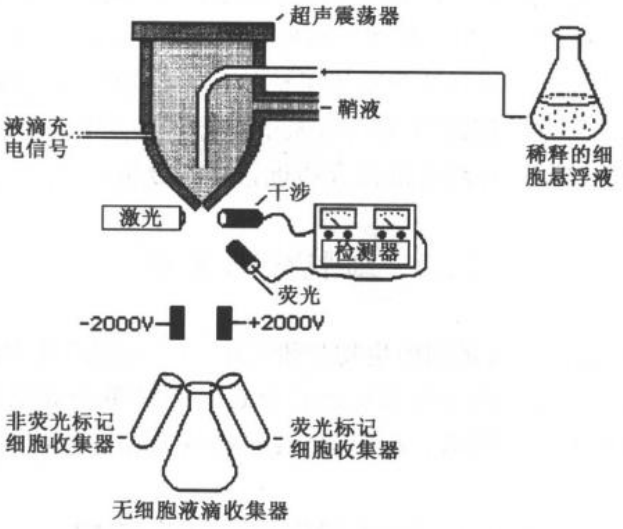


图 2-24　流式细胞仪分选细胞示意图

2.3.3　染色体分选

图 2-25　用于染色体分选的染色体荧光探针标记

也可以用流式细胞仪分选特定的染色体，基本过程与细胞分选相似。不同的是，要用带有荧光标记的 DNA 探针同特异染色体结合，使待分选的染色体带上标记。在染色体分选（chromosome sorting）中，使用的探针是同所感兴趣染色体互补的寡聚核苷酸，这种探针也可同荧光染料偶联。将结合有荧光染料的探针同染色体一起温育，使探针同特异染色体杂交，形成稳定的杂交体（图 2-25），这样染色

体就被带上了荧光标记，稀释后送入流式细胞仪的流室，然后与细胞分选过程一样将特异的染色体分选出来。

2.4 细胞工程技术

细胞工程（cell engineering）技术是细胞生物学与遗传学的交叉领域，主要利用细胞生物学的原理和方法，结合工程学的技术手段，按照人们预先的设计，有计划地改变或创造细胞遗传性的技术。包括体外大量培养和繁殖细胞，或获得细胞产品，或利用细胞体本身。主要内容包括：细胞融合、细胞生物反应器、染色体转移、细胞器移植、基因转移、细胞及组织培养等。

2.4.1 细胞培养

在体外模拟体内的生理环境，培养从机体中取出的细胞，并使之生存和生长的技术称为细胞培养（cell culture）。细胞培养技术是细胞生物学研究方法中最有价值的技术，通过细胞培养可以获得大量的细胞，也可通过细胞培养研究细胞的运动、细胞的信号转导、细胞的合成代谢等。细胞培养的突出特点是在离体条件下观察和研究细胞生命活动的规律。培养中的细胞不受体内复杂环境的影响，人为改变培养条件（如物理、化学、生物等外界因素的变化）即可进一步观察细胞在单因素或多因素的影响下的生理功能变化。然而，细胞在体外环境的局限性，又使细胞的形态与功能不能与体内的同类细胞完全等同。

2.4.1.1 体外细胞培养的条件

体外培养细胞必须注意 3 个环节：物质营养、生存环境和废物的排除。

体外培养细胞所需的营养是由培养基提供的。培养基通常含有细胞生长所需的氨基酸、维生素和微量元素。一般培养细胞所用的培养基是合成培养基，它含有细胞生长必需的营养成分，但是在使用合成培养基时需要添加一些天然成分，其中最重要的是血清，以牛血清为主。这是因为血清中含有多种促细胞生长因子和一些生物活性物质。

由于血清中含有一些不明成分，对于特殊目的细胞培养是不利的。为此，研究人员正在探索无血清培养细胞的条件，并已经取得一些进展。由于机体内的细胞生长通常需要不同的细胞因子进行调节，所以在无血清培养时仍然需要添加必要的因子（表 2-3），包括促细胞生长因子（如 EGF）、促贴附物（如层黏连蛋白）和其他活性物质（如转铁蛋白）。无血清培养排除了有血清培养时血清中不明因素的干扰，使实验结果更加可靠。

体外细胞培养必需模拟体内细胞生长的环境。环境因素主要是指无菌环境、合适的温度、一定的渗透压和气体环境。气体主要有两种：O_2 和 CO_2。后者对于维持细胞培养液的酸碱度十分重要。

活体内生长的细胞所产生的代谢物和废物通过一定的系统进行利用和排除。体外培养细胞产生的代谢物和废物积累在培养液中，所以定期更换培养液，对于体外细胞培养也是至关重要的。

表 2-3　无血清培养基的附加成分

成分	浓度	成分	浓度
激素与生长因子		黄体酮	1～100nmol/L
胰岛素	0.1～1.0g/ml	雌二醇	1～10 nmol/L
胰高血糖素	0.05～5g/ml	睾丸素	1～10 nmol/L
表皮生长因子	1～100ng/ml	**结合蛋白**	
神经生长因子	1～10ng/ml	转铁蛋白	0.5～100g/ml
Gimmel 因子	0.5～10g/ml	无脂肪酸的 BSA	1mg/ml
成纤维生长因子	1～100ng/ml	**附着和铺展因子**	
促卵泡激素	50～500ng/ml	冷不溶球蛋白	2～10g/ml
生长激素	50～500ng/ml	血清铺展因子	0.5～5g/ml
黄体生成素	0.5～2g/ml	胎球蛋白	0.5mg/ml
促甲状腺激素释放激素	1～10ng/ml	胶原胶	贴附底物
促卵泡激素释放素	1～10ng/ml	**低分子质量的营养因子**	
前列腺素 E1	1～100ng/ml	H_2SeO_3	10～100 nmol/L
前列腺素 F2	1～100ng/ml	腐胺	1000μmol/L
甲状旁腺（激）素	1ng/ml	抗坏血酸	10μg/ml
生长调节素 C	1ng/ml	维生素 E，生育酚	10μg/ml
三碘化甲状腺氨酸	1～100pM	亚油酸	3～5ng/ml
氢化可的松	10～100nmol/L	维生素 A	10ng/ml

2.4.1.2　原代培养

原代培养（primary culture）是指直接从机体取下细胞、组织和器官后立即进行培养。因此，较为严格地说是指成功传代之前的培养，此时的细胞保持原有细胞的基本性质，如果是正常细胞，仍然保留二倍体数。但实际上，通常把第 1 代至第 10 代以内的培养细胞统称为原代细胞培养。最常用的原代培养有组织块培养和分散细胞培养。

组织块培养是将剪碎的组织块直接移植在培养瓶壁上，加入培养基后进行培养。

分散培养则是将组织块用机械法或化学法使细胞分散。如欲从胎儿或新生儿的组织分离到活性最好的游离细胞，经典的方法是用蛋白水解酶（如胰蛋白酶和胶原酶）消化细胞间的结合物，或用金属离子螯合剂（如 EGTA）除去细胞互相黏着所依赖的 Ca^{2+}，再经机械轻度振荡，使之成为单细胞。

细胞培养的一般过程如图 2-26 所示。

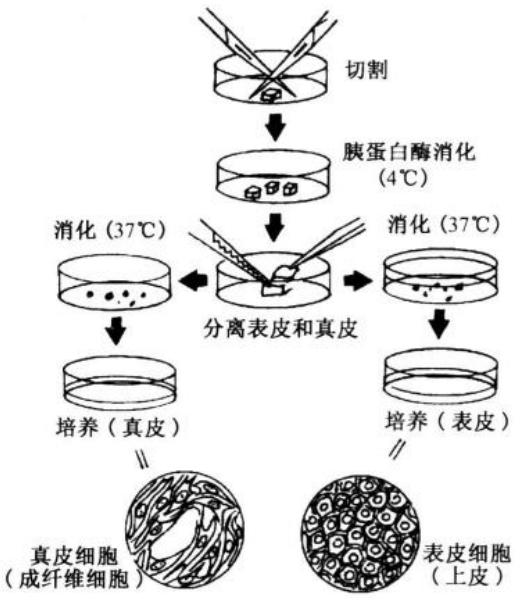


图 2-26　人的细胞培养（引自鄂征，1996）

2.4.1.3 细胞系和细胞株

原代培养物经首次传代成功后即为细胞系（cell line），由原先存在于原代培养物中的细胞世系所组成。如果不能继续传代，或传代次数有限，可称为有限细胞系（finite cell line），如可以连续培养，则称为连续细胞系（continuous cell line），培养 50 代以上并无限培养下去。

从一个经过生物学鉴定的细胞系由单细胞分离培养或通过筛选的方法由单细胞增殖形成的细胞群称细胞株（cell strain）。所以细胞株是通过选择法或克隆形成法从原代培养物或细胞系中获得的具有特殊性质或标志的培养细胞。从培养代数来讲，可培养到40～50 代。

2.4.1.4 动物细胞培养方法

动物细胞培养分为贴壁培养和悬浮培养。

分散的细胞悬浮在培养瓶中很快（几十分钟至几小时）就贴附在瓶壁上，称为细胞贴壁，贴壁后的细胞形态形成多态性，呈单层生长，所以此法又叫单层细胞培养。单层培养的细胞保持接触抑制（contact inhibition）的特性。

悬浮培养的细胞在培养过程中不贴壁，一直悬浮在培养液中生长，如 T 细胞的培养就是如此。悬浮培养的条件较为复杂，难度也大一些，但是容易同时获得大量的培养细胞。

2.4.1.5 植物组织培养

由于植物细胞不能像动物细胞那样在培养瓶中形成分散的单个细胞传代培养，所以在植物方面主要是组织培养。

植物组织培养（plant tissue culture）是根据植物细胞的全能性发展起来的利用植物植株的不同组织培养成完整植株的方法。例如叶片、茎段、根等都可以通过诱导形成愈伤组织，而后培养成植株。愈伤组织（callus，culli）的原意为植物受创伤后，在伤面新生的组织。其原因是由于受创伤的刺激，伤面附近的生活组织恢复了分裂机能，加速增生而将伤面愈合。在植物组织培养中的愈伤组织是指植物细胞在组织培养过程中形成的无一定结构的组织团块。在适宜的条件下，愈伤组织可再分化，形成芽、根，再生成植株。植物组织培养是进行植物转基因的重要步骤。（图 2-27）。

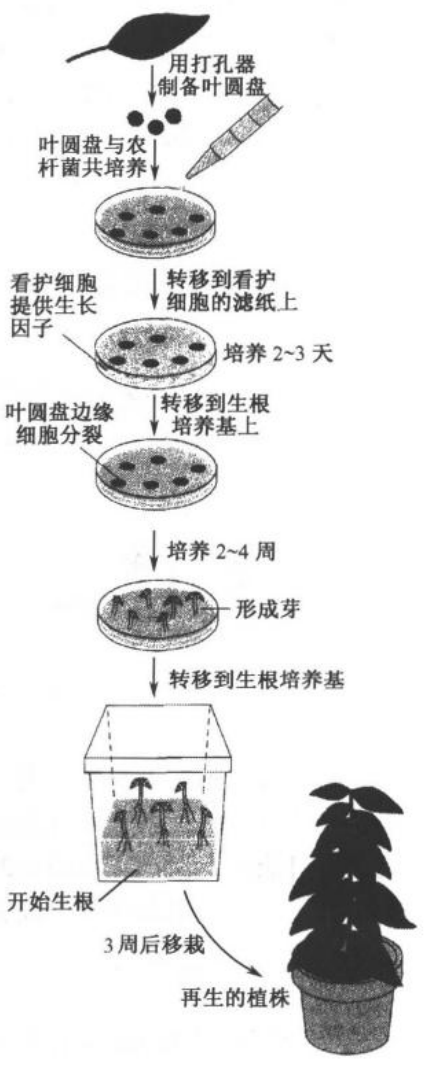


图 2-27 转基因植物组织培养
（引自 Watson *et al.*，1994）

2.4.1.6 植物原生质体培养

一般采用植物的体细胞（二倍体细胞），先经纤维素酶处理去掉细胞壁，这种脱去细胞壁的细胞称为原生质体。将原生质体放在合适的培养基上，经过诱导分化可以重新长成植株。原生质体也可用于植物细胞融合，然后诱导形成新的植株。

2.4.2 细胞融合与单克隆抗体技术

细胞融合（cell fusion）即细胞杂交，是在细胞水平上改造生物遗传性的主要方法。

2.4.2.1 细胞融合

细胞融合是指自发或人工诱导下，两个不同基因型的细胞或原生质体融合形成一个杂种细胞。基本过程包括细胞融合形成异核体（heterokaryon）、异核体通过细胞有丝分裂进行核融合、最终形成单核的杂种细胞（图 2-28）。有性繁殖时发生的精卵结合是正常的细胞融合，即由两个配子融合形成一个新的二倍体。

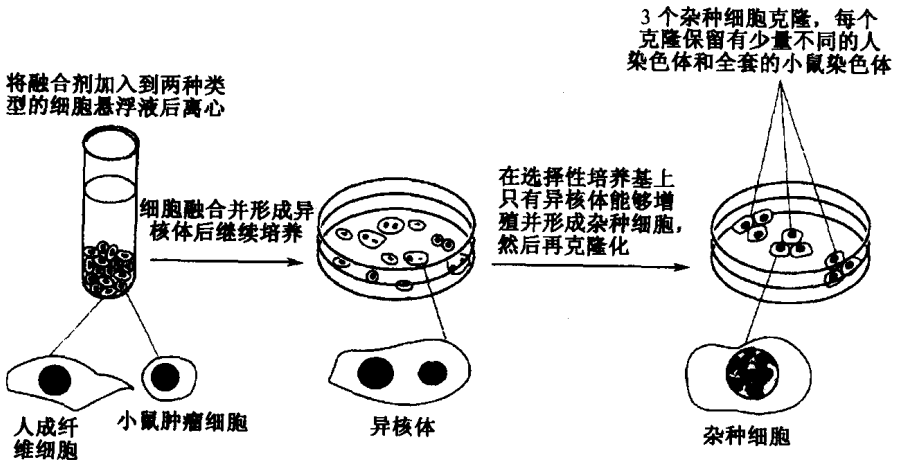


图 2-28 细胞融合（引自 Alberts *et al*., 1994）

自发的动物细胞融合概率很低，1962 年 Okada 和 Tadokoro 发现灭活的仙台病毒有促进细胞融合的作用，这是由于病毒的磷脂外衣与动物细胞的膜十分相似的缘故。病毒外壳上的某些糖蛋白可能具有促进细胞融合的功能。此外，用聚乙二醇（polyethylene glycol，PEG）作为细胞融合剂，它可引起邻近的细胞膜的黏合，继而使细胞融合成为一个细胞。

2.4.2.2 单克隆抗体技术

1975 年英国科学家 Milstein 和 Köhler 发明了单克隆抗体（monoclonal antibody）技术，因此获得 1984 年诺贝尔医学奖。单克隆抗体技术是将产生抗体的单个 B 淋巴细胞同肿瘤细胞杂交的技术，其原理是：B 淋巴细胞能够产生抗体，但在体外不能无限分裂；而瘤细胞虽然可以在体外进行无限传代，但不能产生抗体。将这两种细胞融合后得到的杂交瘤细胞具有两亲本

细胞的特性，既能产生抗体又能无限增殖。

图 2-29 所示是单克隆抗体制备流程。首先用一种抗原注射小鼠，引起产生特异抗体的细胞大量增殖，取出小鼠的脾，分离产生抗体的淋巴细胞，同骨髓瘤细胞进行融合，在 HAT 培养基上进行初步筛选后，经过进一步鉴定，得到生产单克隆抗体的细胞。

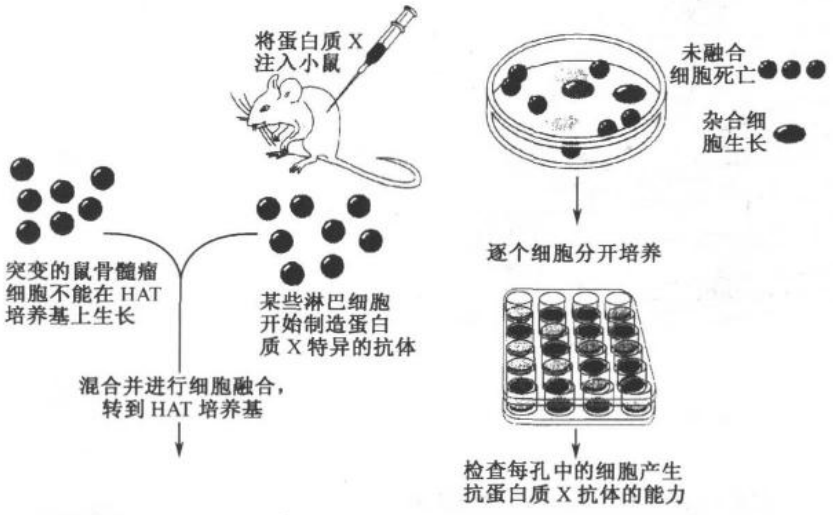


图 2-29　单克隆抗体技术（引自 Karp，1999）

筛选用的 HAT 培养基是选择性培养基，含有次黄嘌呤（hypoxanthine，H）、氨基蝶呤（aminopterin，A）和胸腺嘧啶（thymine，T）核苷。在 HAT 培养基中，只有肿瘤细胞和正常细胞融合形成的杂交瘤细胞才能生存，而未融合的肿瘤细胞、正常细胞及非肿瘤细胞和正常细胞融合形成的细胞都会死亡。因为，正常的未融合细胞具有核酸合成主通路和旁路所必需的酶但不能在体外长期生长；突变后的肿瘤细胞只具有 RNA 和 DNA 合成所必需的主通路的酶，而缺乏利用胸腺嘧啶核苷合成 DNA 的胸腺嘧啶核苷激酶（TK）或缺乏利用次黄嘌呤合成 RNA 的磷酸核糖转移酶（HGPRT）。当这些细胞的核酸合成主通路被培养基中氨基蝶呤阻断后，则因核酸合成障碍而死亡。只有肿瘤细胞和具有合成旁路酶的正常细胞形成的融合细胞，才能在氨基蝶呤、次黄嘌呤和胸腺嘧啶核苷存在的情况下利用其中的次黄嘌呤和胸腺嘧啶核苷合成核酸而得以生存。由于融合细胞具有肿瘤细胞和抗体分泌细胞双重特征，所以在去除氨基蝶呤这一核酸阻断剂后即可在正常培养基中长期传代增殖，并分泌抗体。在 HAT 培养基中生存下来的细胞，可以是各种正常细胞与瘤细胞的融合体，还可能是多克隆杂交瘤细胞的混合群体，因此须进一步用稀释法分离出单克隆的杂交瘤细胞和筛选出识别特异性抗原的抗体分泌克隆，才能最终得到特异性单克隆抗体杂交瘤细胞株。

2.4.2.3　显微操作术

用显微操作（micromanipulation）装置对细胞进行解剖手术和微量注射的技术属显微操作技术。显微操作仪是在显微镜下对细胞进行显微操作的装置（图 2-30），可用于细胞核移植、基因注入、染色体微切和胚胎切割等手术。

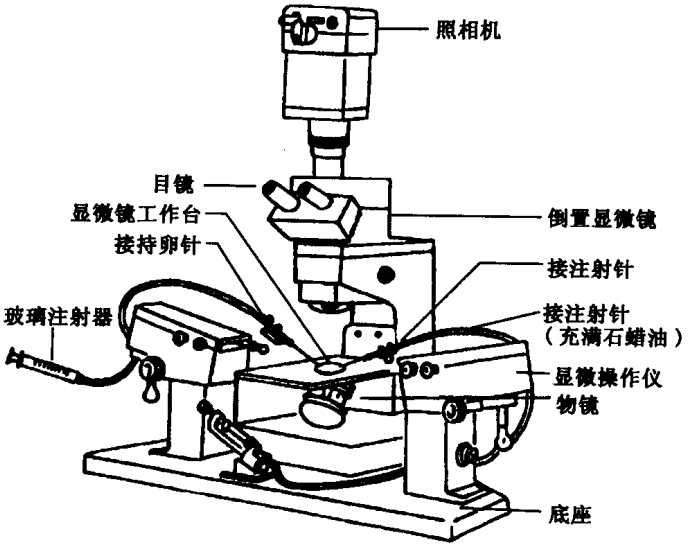


图 2-30　显微操作仪

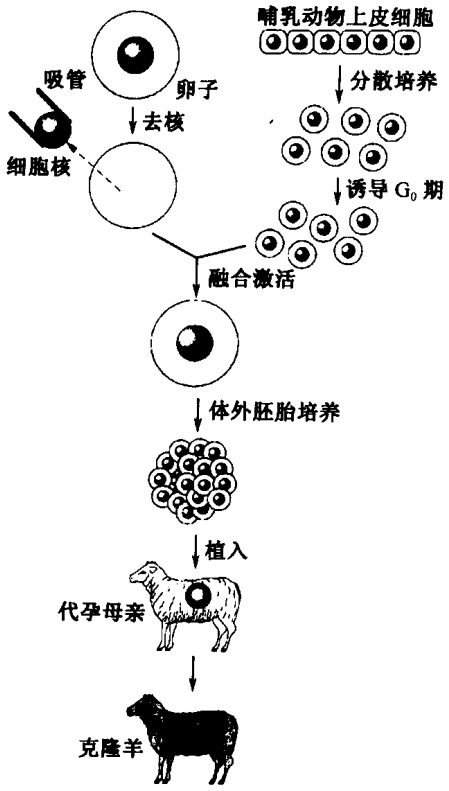


图 2-31　细胞核移植克隆绵羊
（引自 Glick *et al*. 1999）
用吸管移去卵细胞的核，来自成年绵羊的乳腺上皮细胞经培养并抑制生长诱导进入 G_0 期。G_0 细胞与去核卵细胞融合，融合的卵经培养至胚胎早期，然后植入体内继续发育。实验是 Wilmut 等完成的（1997），277 个去核卵细胞与 G_0 期乳腺细胞融合，得到 29 个早期胚胎，最后得到一只存活的羊羔。

2.4.3　动物细胞核移植克隆技术

1997 年，英国苏格兰罗斯林研究所 Wilmut 等首次成功通过细胞融合技术利用成年动物彻底分化的体细胞克隆出子代个体，开创了动物体细胞克隆的新时代。

Wilmut 等从成年个体母羊的乳腺组织分离单个乳腺细胞，然后与去核的羊的卵细胞融合，克隆得到一头绵羊“Dolly”（图 2-31）。

动物体细胞克隆技术的成功对生命科学的发展具有重要的推动作用，有巨大的应用前景。例如结合转基因技术生产药物。现在很多药物如胰岛素、生长激素、表皮生长因子等都是动物细胞体内正常的代谢物，某些病人由于产生这些物质的功能发生缺陷，导致了相应疾病的发生，目前的治疗方法就是给这些病人注射这类药物。由于这类药物本身是来自动物的某些脏器，制备这种药物就需要大量的动物提供脏器，因此成本就很高。如果通过转基因技术把相应的基因转入到哺乳动物，让动物的乳汁生产具有疗效的蛋白质就会降低成本，再结合动物体细胞克隆技术，将这种转基因动物大量无性繁殖克隆，就可以大大提高产量，大幅度降低成本，同时也保证了所转基因的稳定。该项技术也可以生产供动物本身和人类器官移植的动物，解决器官捐赠长期缺乏的问题。另外，动物体细胞克隆技术在基因结构和功能、基因治疗、遗传病及人类衰老等的研究方面都具有巨大的潜力。

2.5 分离技术

分离技术是一大类技术的总称，包括细胞组分的分离和生物大分子的分离。

2.5.1 离心分离技术

大多数细胞都含有许多不同的细胞器。如果要研究线粒体的某一功能，或者要研究高尔基体某种酶的功能，首先必须分离纯化线粒体或高尔基体，然后进行线粒体的某种功能研究或是从纯化的高尔基体中分离纯化所要研究的酶。离心分离细胞组分和生物分子是最常用的分离方法，因为不同的细胞器和分子有不同的体积和密度（图 2-32），可在不同离心力的作用下沉降分离。影响被分离的颗粒在离心过程中行为的主要因素是颗粒的体积和密度。根据这两个因素设计了不同的离心分离方法。常用的两类离心分离方法是速度离心（velocity centrifugation）和等密度离心（isodensity centrifugation）。

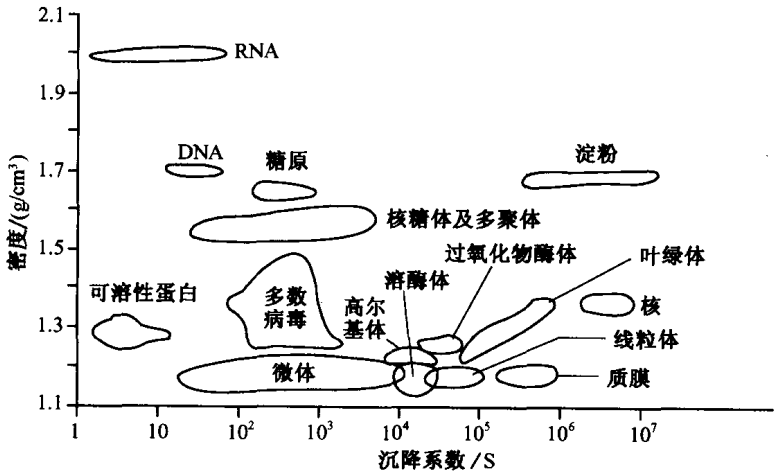


图2-32 不同的细胞器、大分子和病毒的密度及相应的沉降系数(引自 Kleinsmith *et al*., 1995)

2.5.1.1 速度离心分离细胞器和大分子

最常用的离心分离细胞组分和大分子的方法是速度离心，这一方法的基本原理主要是根据被分离物质的体积差异。在速度离心时，如果分离的细胞器或分子的密度比介质的密度大就会沉到离心管底部。在一定的离心速度下，不同大小的细胞器由于体积的不同，沉降的速度也就不同，体积大的沉降得快，反之沉降得慢。

在速度离心分离中又有两种不同的方法，一种是差速离心（differential centrifugation），主要是采取逐渐提高离心速度的方法分离不同大小的细胞器。起始的离心速度较低，让较大的颗粒沉降到管底，小的颗粒仍然悬浮在上清液中。收集沉淀，改用较高的离心速度离心悬浮液，将较小的颗粒沉降，以此类推，达到分离不同大小颗粒的目的（图 2-33）。

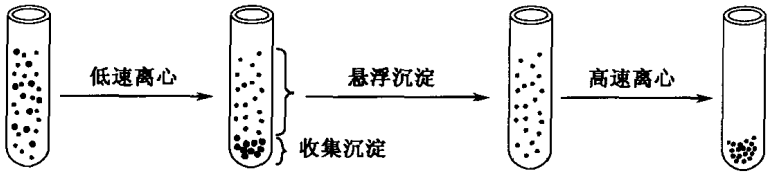


图 2-33　差速离心的原理

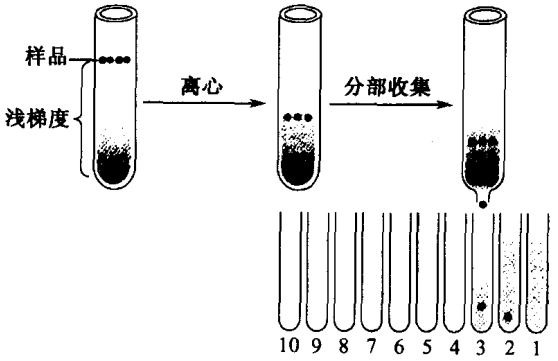


图 2-34　移动区带离心分离

将含有两种大小稍微不同的颗粒样品小心加在有轻微梯度的离心管介质的液面上(蔗糖或甘油)。离心适当时间,样品中的颗粒向管底部移动(不能离心太久,否则两种颗粒都会沉淀到底部),由于大小的不同,移动的区带速度不同。然后收集不同区带的样品进行分析。

另一种利用速度离心分离细胞组分的方法是移动区带离心(moving-zone centrifugation)。这一方法需要用蔗糖或甘油制备轻微的连续密度,然后将待分离的样品加在离心管的最上层,形成一狭窄的带,再通过较长时间的离心。在离心过程中,大小、形状、密度不同的颗粒就会分开(图 2-34),最后收集各区带得到要分离的物质。在此方法中,分离介质对被分离的物质必须是中性无害的,并且密度梯度较低,底部的密度比管顶部的密度大,建立密度梯度的目的是防止扩散。重要的是,待分离颗粒的密度比离心管中任何部分介质的密度都要大。常用的是蔗糖密度梯度离心(sucrose density gradient centrifugation)。

2.5.1.2　等密度离心分离细胞器和大分子

与速度离心分离不同,等密度离心分离样品主要是根据被分离样品的密度。在这种离心分离方法中,要用介质产生一种密度梯度,这种密度梯度覆盖了待分离物质的密度,这样,通过离心使不同密度的颗粒悬浮到相应的介质密度区。在这种梯度离心中,颗粒的密度是影响最终位置的惟一因素,因此用这种方法分离颗粒,主要是根据被分离颗粒的密度差异。只要被分离颗粒间的密度差异大于 1% 就可用此法分离。

蔗糖或者甘油(它们的最大密度是 $1.3g/cm^3$)通常可用于分离膜结合的细胞器,如高尔基体、内质网、溶酶体和线粒体(图 2-35)。在等密度梯度离心中蔗糖或甘油的梯度的作用与移动区带离心中梯度原理是不同的,在移动区带离心中梯度的惟一目的是减少样品的扩散,即使是在离心管的底部,颗粒的密度也比介质大。相反,在等密度梯度离心中,使用的密度是足以阻止颗粒移动的密度,当颗粒达到与本身密度相同的密度区时就会停留在该区域。

离心分离密度大于 $1.3g/cm^3$ 的样品,如 DNA、RNA,需要使用密度比蔗糖和甘油大的介质。重金属盐氯化铯(CsCl)是目前使用的最好的离心介质,它在离心场中可自行调节形

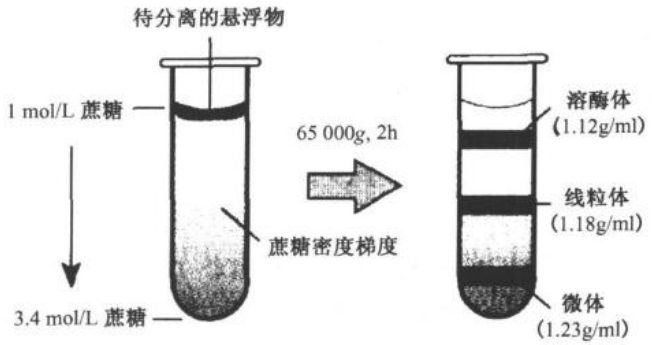


图 2-35　密度梯度离心分离溶酶体、线粒体和微体

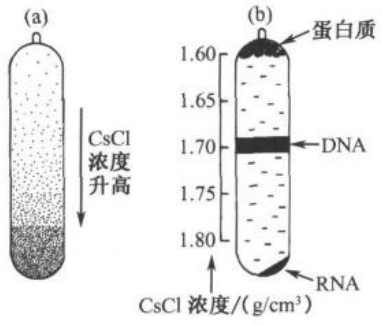


图 2-36　CsCl 密度梯度离心分离 DNA

成浓度梯度，并能保持稳定。在氯化铯形成的密度梯度中，离心管顶部的密度为 1.65g/cm^3，底部为 1.75g/cm^3。因为 DNA 的密度是 1.70g/cm^3，会停留在离心管的中部（图 2-36）。

由于 CsCl 可自行形成密度梯度，所以不必特别制备密度梯度，只要将待分离的样品与之混匀即可。在离心的过程中，具有不同密度的颗粒随 CsCl 密度梯度的形成重新分配，所以又称为浮力密度离心（buoyant density centrifugation）。

采用何种方法分离细胞的组分或生物大分子，要根据研究对象来决定。如果样品中颗粒的大小和沉降系数差别很大，一般采用差速离心法就可以达到分离目的；如果颗粒的大小差别不大而密度有差别，则应用密度梯度离心。

另外，在选择分离方法的同时要考虑介质的选择。理想的介质材料应是形成的密度范围大、黏度低、对细胞结构成分的损害小，离心分离后容易去除，浓度容易测定等。蔗糖和甘油的最大密度是 1.3×10^3 kg/m^3，能用来分离较低密度的膜结合细胞器。重金属盐溶液的最大密度可达 1.9×10^3 kg/m^3，可用来分离密度大的物质。

在速度离心时，被分离的分子越小，需要的离心速度越高。但是，离心机中影响速度高低的是转子的半径。离心力（g）是表示某种颗粒沉淀的最好方式，一般根据离心力和离心机转子的半径决定离心速度。常见细胞器离心沉淀所需的离心力列于表 2-4。

表 2-4　不同的细胞结构分离所需的离心力

结　构	离心力/g
细胞核	800～1 000
线粒体	20 000～30 000
叶绿体	20 000～30 000
溶酶体	20 000～30 000
微体	20 000～30 000
糙面内质网	50 000～80 000
质膜和光面内质网	80 000～100 000
游离核糖体、病毒粒子	150 000～300 000

2.5.2　层析分离技术

层析（chromatography）是广泛使用的分离蛋白质的方法，它是根据蛋白质的形态、大小和电荷的不同而设计的物理分离方法。各种不同的层析方法都涉及共同的基本特点：有一个固定相和流动相，当蛋白质混合溶液（流动相）通过装有珠状或基质材料的管或柱（固定相）时，由于混合物中各组分在物理化学性质（如吸引力、溶解度、分子的形状与大小、分子的

电荷性与亲和力）等方面的差异使各组分在两相间进行反复多次的分配而得以分开。流动相的流动取决于引力和压力，而不需要电流。用层析法可以纯化得到非变性的、天然状态的蛋白质。层析的方法很多，其中凝胶过滤层析、离子交换层析、亲和层析等是目前最常用的层析方法。

2.5.2.1 凝胶过滤层析

凝胶过滤层析（gel filtration chromatography）又称排阻层析或分子筛法，主要是根据蛋白质的大小和形状，即蛋白质的质量进行分离和纯化。层析柱中的填料是某些惰性的多孔网状结构物质，多是交联的聚糖（如葡聚糖或琼脂糖）类物质，使蛋白质混合物中的物质按分子大小的不同进行分离（图 2-37）。

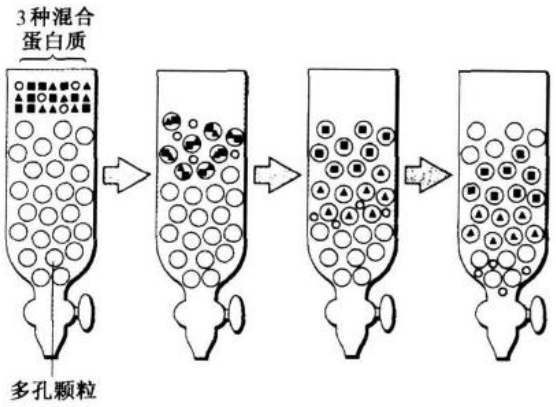


图 2-37 凝胶层析法

3 种不同的蛋白质根据它们大小的不同在层析柱中被分离。

假定有 3 种分子质量不同的蛋白质溶解在一起，它们的分子质量分别是：75kDa、125kDa、250kDa。现要将 125kDa 的蛋白质纯化出来，可选用 G150 葡聚糖凝胶层析法。蛋白质溶液进入柱床之后，3 种分子质量不同的蛋白质做不同的运动。由于葡聚糖 G150 能够让 200kDa 以下的蛋白质进入，层析时 3 种蛋白质中只有 250kDa 的蛋白质不能进入 G150 的小孔而直接向下流出。另外两种蛋白质由于分子质量小从而进入了凝胶。在洗脱时，由于 75kDa 的蛋白质的分子质量小，在凝胶中扩散的距离较长，而 125kDa 的蛋白质分子质量较大，扩散的距离较短，所以被先洗脱出来，从而被纯化。

2.5.2.2 亲和层析

在生物分子中有些分子的特定结构部位能够同其他分子相互识别并结合，如酶与底物的识别结合、受体与配体的识别结合、抗体与抗原的识别结合，这种结合既是特异的，又是可逆的，改变条件可以使这种结合解除。生物分子间的这种结合能力称为亲和力。亲和层析（affinity chromatography）就是根据这样的原理设计的蛋白质分离纯化方法。

将具有特殊结构的亲和分子制成固相吸附剂放置在层析柱中，当要被分离的蛋白质混合

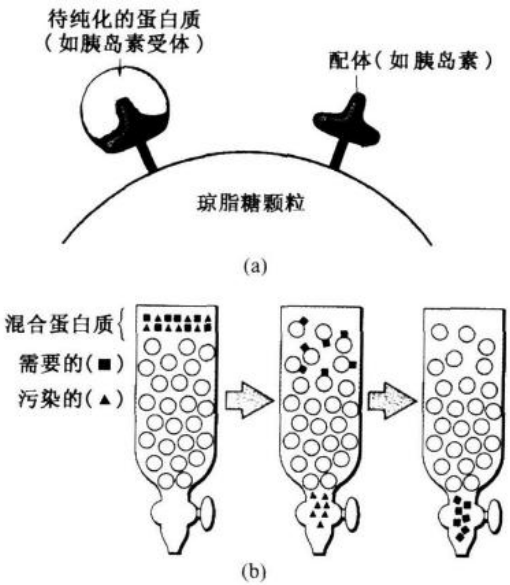


图 2-38 亲和层析（引自 Karp, 1999）

(a) 琼脂糖珠的表面吸附剂（如胰岛素配体）只能同特异的受体结合（如胰岛素）；(b) 亲和层析的基本步骤。

液通过层析柱时，与吸附剂具有亲和能力的蛋白质就会被吸附而滞留在层析柱中。那些没有亲和力的蛋白质由于不被吸附，直接流出，从而与被分离的蛋白质分开，然后选用适当的洗脱液，改变结合条件将被结合的蛋白质洗脱下来（图 2-38）。

这种层析方法条件温和，过程简单，纯化的倍数高，可达几千倍级，而且活性物质的回收率高，因此是一种广泛使用的层析方法。

2.5.2.3 离子交换层析

离子交换层析（ion-exchange chromatography）是根据蛋白质所带电荷的差异进行分离纯化的一种方法。蛋白质的带电性是由蛋白质多肽中带电氨基酸决定的。由于蛋白质中氨基酸的电性又取决于介质中的 pH，所以蛋白质的带电性也就依赖于介质的 pH。当 pH 较低时，负电基团被中和，而正电基团就很多；在 pH 较高时，蛋白质的电性与低 pH 时相反。当蛋白质所处的 pH，使蛋白质的正负电荷相等，此时的 pH 称为等电点。

离子交换层析所用的交换剂是经酯化、氧化等化学反应引入阳性或阴性离子基团制成的，可与带相反电荷的蛋白质进行交换吸附。带有阳离子基团的交换剂可置换吸附带负电荷的物质，称为阴离子交换剂，如 DEAE -纤维素树脂；反之称为阳离子交换剂，如 CM -纤维素树脂。不同的蛋白质有不同的等电点，在一定的条件下解离后所带的电荷种类和电荷量都不同，因而可与不同的离子交换剂以不同的亲和力相互交换吸附。当缓冲液中的离子基团与结合在离子交换剂上的蛋白质相竞争时，亲和力小的蛋白质分子首先被解吸附而洗脱，而亲和力大的蛋白质则后被解吸附和洗脱。因此，可通过增加缓冲液的离子强度和（或）改变酸碱度，改变蛋白质的吸附状况，使亲和力不同的蛋白质得以分离（图 2-39）。

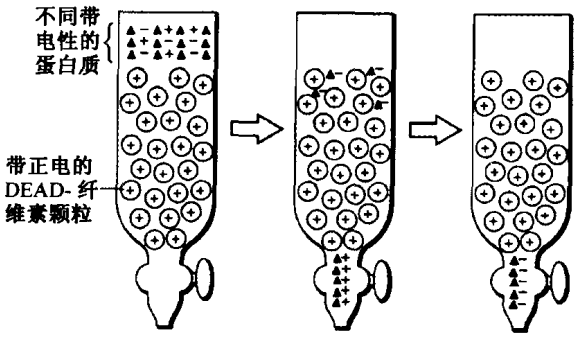


图 2-39 离子交换层析（引自 Karp, 1999）
通过 DEAE -纤维素将两种不同带电性的蛋白质分离开。图中显示的是带正电的离子交换树脂结合带负电的蛋白质。

2.6 分子生物学方法

分子生物学方法是在分子水平上研究生物大分子的结构和功能的一系列方法，包括基因重组技术、基因转移、分子杂交、PCR 反应、序列分析等等，本节摘要介绍几种。

2.6.1 基因工程技术

又称基因操作（gene manipulation），重组 DNA（recombinant DNA）技术。基因工程（gene engineering）是以分子遗传学为理论基础，以分子生物学和微生物学的现代方法为手段，将不同来源的基因（DNA 分子），按预先设计的蓝图，在体外构建杂种 DNA 分子，然后

导入活细胞，以改变生物原有的遗传特性、获得新品种、生产新产品。基因工程技术为基因的结构和功能的研究提供了有力的手段。

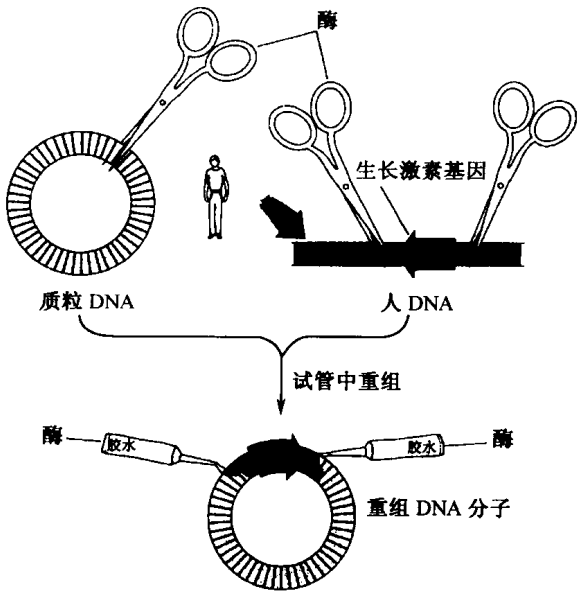


图 2-40　DNA 的分子操作

基因克隆（gene cloning）技术是 20 世纪 70 年代发展起来的一项具有革命性的研究技术，它的发明和发展，使生物学家能够在体外进行基因操作、基因转移、基因定点突变等研究。这项技术可概括为：分、切、连、转、选。“分”是指分离制备合格的待操作的 DNA，包括作为载体的 DNA 和欲克隆的目的 DNA；“切”是指用序列特异的限制性内切核酸酶切开载体 DNA，或者切出目的基因；“连”是指用 DNA 连接酶将目的 DNA 同载体 DNA 连接起来，形成重组的 DNA 分子；“转”是指通过特殊的方法将重组的 DNA 分子送入宿主细胞中进行复制和扩增；“选”则是从宿主群体中挑选出携带有重组 DNA 分子的个体。基因工程技术的两个最基本的特点是分子水平上的操作和细胞水平上的表达，而分子水平上的操作即是体外重组的过程，实际上是利用工具酶对 DNA 分子进行“外科手术”（图 2-40）。

2.6.2　基因作图与人类基因组计划

20 世纪 80 年代后期由美国能源部提出，并于 1988 年得到美国国会批准的人类基因组计划（Human Genome Project，HGP）是当今国际生物学与医学领域内一项最引人注目的跨世纪重大研究项目。其目标是用 15 年时间测出 24 条染色体 DNA 的全部核苷酸序列，拟阐明人类遗传信息的组成及其约 3～5 万个基因的结构和定位。

有几个基因组制图和测序计划，包括线虫、酵母、小鼠和人。基因组计划的主要目的是测出各生物的基因组 DNA 的全序列。

这项计划的任务之大、问题之复杂是空前的。例如第一个完成的酵母染色体全序列（酵母染色体），全长为 315kb 的 DNA、182 个可读框（每个长度超过 100 个氨基酸），共涉及 35 个实验室的 100 多位研

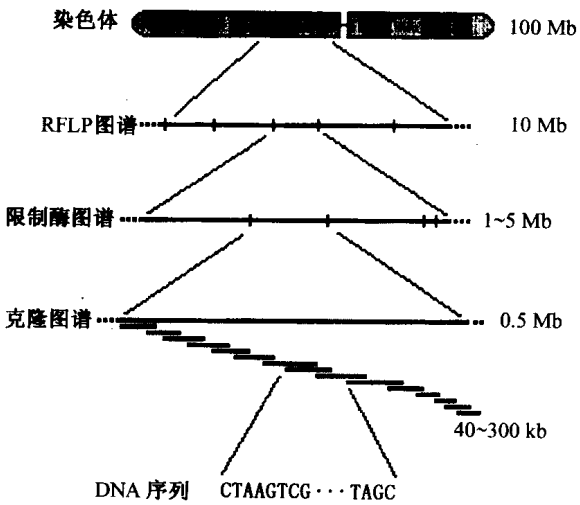


图 2-41　人类基因组研究策略

究人员。

人基因组含 22 对常染色体和一对性染色体，总长度为 3×10^9 bp（3000Mb），一条人的染色体含有 100Mb 以上的 DNA，约是酵母染色体的 300 倍，所以人类基因组计划的基因作图是相当繁重的任务。为了完成这项复杂的任务，采取了分级完成的策略，即从4个不同水平进行：RFLP图谱、限制酶图谱、克隆图谱、DNA序列图谱，逐级提高分辨率（图 2-41）。

基因组制图的第一步是建立 RFLP 图谱，主要是在 5～10Mb 长度的片段上找出分子标记，这个水平的分辨率最低。第二个水平是限制酶作图，范围缩小到 1～5Mb；第三个水平是建立小片段的克隆群，每个克隆间有一定程度的重复。第四个水平的精确度最高，就是测出染色体中 DNA 的精确碱基组成。

RFLP 图谱有两方面的应用，首先 RFLP 图谱可为引起疾病的基因座两侧找出分子标记，第二是为二级制图（限制酶图谱）提供框架。用限制酶在染色体的特异位点切割 DNA 获得一定长度的 DNA 片段是该项计划的基础，有许多技术问题需要解决，如哺乳动物的 DNA 中广泛存在甲基化，极大地影响限制酶对 DNA 的降解。构建了限制酶图谱，就可建立与 RFLP 分子标记的物理关系，并确定克隆的方向。

人类基因组计划的实施和完成具有极其深远的意义。①用于致病基因及疾病相关基因的分离。已发现的人类遗传性疾病已有五千多种，分离引起遗传病的异常基因，对了解其发病机制和遗传病的治疗是至关重要的。②加快肿瘤发病机制的研究。③促进对心血管疾病分子机制研究。④基因诊断与基因治疗。⑤研究空间结构对基因调控的作用。

2000 年初，人基因组草图已经完成，各国科学家正在筹划后基因组计划，即如何利用人基因组计划的成果解决人口、粮食、能源、健康等问题。

2.6.3 PCR 技术

PCR 是英文聚合酶链式反应（polymerase chain reaction）的简称，是 Mullis 在 1983 年发明的一项具有重大意义的分子生物学技术（图 2-42）。

PCR 技术的基本原理是 DNA 的半保留复制。由于 DNA 复制是半保留的，两条链都可以作为模板。在 DNA 复制时，需要一个 RNA 引物，同时需要 DNA 聚合酶、4 种单核苷酸和一些辅助因子。在体内，DNA 的复制是周期性的，所以基因扩增的数量有限。

PCR 技术在体外利用人工合成的引物，再加上 DNA 聚合酶和一些合适的底物和因子，通过对温度的控制，使 DNA 不断处于变性、复性和合成的循环之中，达到扩增目的 DNA 的目的。

PCR 方法可以简单地分为 4 步：即引物设计和合成、DNA 模板的制备、PCR 反应、产物的分离和纯化。

PCR 不仅用于扩增目的 DNA，现在有着十分广泛的用途。如合成基因、基因的定点突变、考古研究、法医学、疾病诊断等。

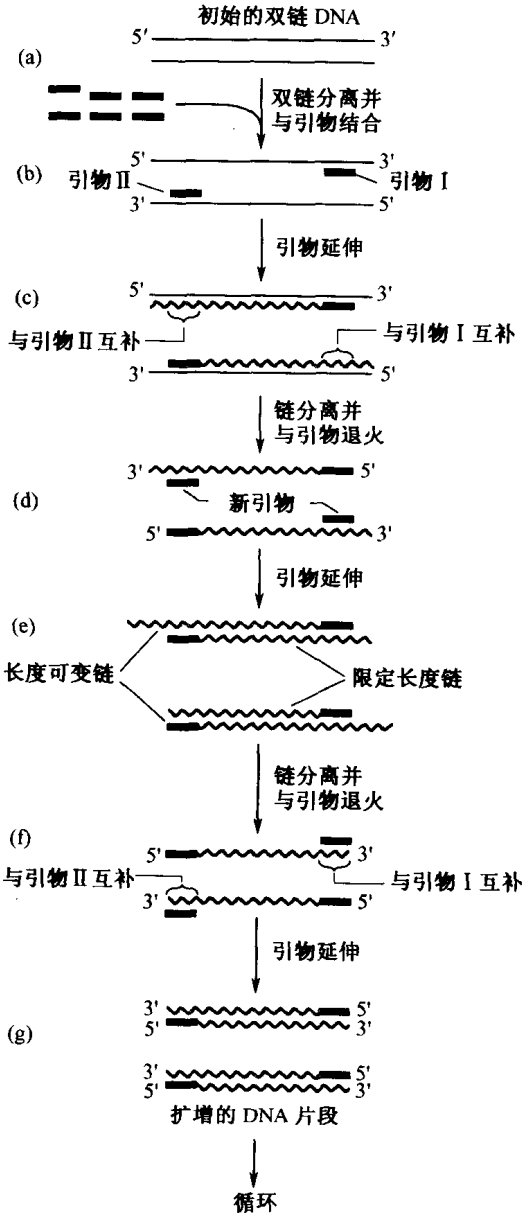


图 2-42　PCR 技术示意图（引自 Watson *et al*., 1994）

2.6.4　选择性基因剔除与转基因鼠

基因工程技术的建立使人们能够对 DNA 先进行克隆，随后筛选鉴定特定功能的基因，而不必预先知道所克隆的 DNA 具有何种功能，基因剔除是最有效的方法之一。基因剔除（gene knockout）是指一个有功能的基因通过基因工程方法完全被剔除的人工突变技术。这项技术是 Capecchi 于 20 世纪 80 年代末在 Utah 大学发展起来的。实验的动物通常是小鼠，被剔除了功能基因的小鼠就称为剔除小鼠（knockout mice）。基因剔除技术已成功地应用于几种遗传病的研究，还可用于研究特定基因的细胞生物学活性以及研究发育调控的基因作用等，因

此是研究基因功能的一项非常有用的技术。

基因剔除是一套组合技术，包括基因重组、细胞分离、转基因等。图 2-43 显示了获得剔除囊性纤维化跨膜传导调节蛋白（cystic fibrosis transmembrane conductance regulator，CFTR）基因小鼠的两个关键技术：体外重组与转基因鼠。

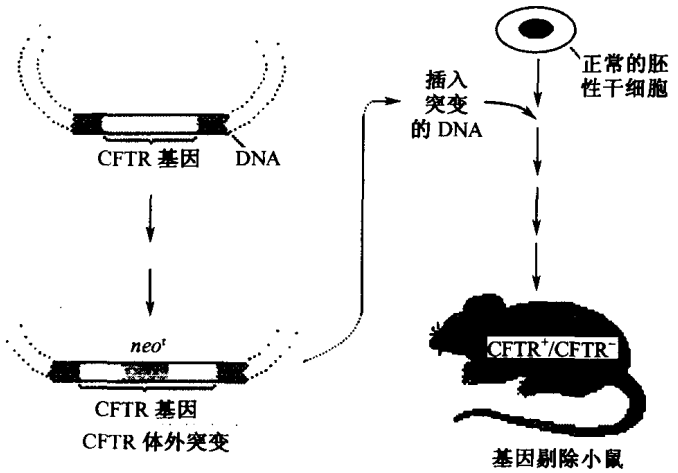


图 2-43　转基因剔除小鼠的获得

在这个例子中，要剔除的基因 CFTR 编码一种与囊性纤维有关的蛋白质。为了获得 CFTR 剔除的小鼠，要分两步走：第一步是如何将分离的 CFTR 基因进行体外突变，并且将之改造以适合插入到小鼠的基因组中；第二步是如何获得剔除小鼠（$CFTR^-$ 纯合体）。

2.6.4.1　CFTR 突变 DNA 的体外构建

要获得 CFTR 基因剔除的小鼠，就分子水平上的工作来说，要注意两个问题：一是通过一般的分子生物学方法，将 DNA 片段定向插入到目的染色体特定部位的效率非常之低，并且会随机地插入到非靶向染色体中，因此必须解决使外源突变的 DNA 插入到正确的染色体中的方法。另一个问题是如何有效地将插入有特定 DNA 片段的细胞选择出来。为了解决这两个问题，可采取以下两种措施。

第一，在克隆的 CFTR 基因中插入一个正选择标记（positive select marker），即将 neo^r 基因插入到 CFTR 基因中，这样在 CFTR 基因突变的同时，获得 neo^r 的抗性表型（图 2-44）。用这种重组的 DNA 转化细胞，受体细胞会产生两种表型效应：靶基因（CFTR）失活了，但同时获得正选择标记，因为获得 neo^r 抗性基因的细胞可以在加有新霉素的培养基中生长，而没有得到突变 CFTR 基因的细胞仍然对新霉素敏感，这样就可以分离和鉴定靶细胞了。

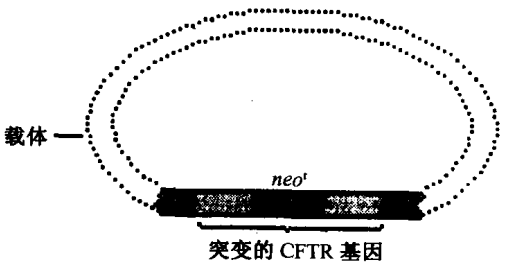


图 2-44　在 CFTR 基因中插入正选择标记，同时使 CFTR 基因失活

第二，在CFTR基因旁引入一个负选择标记（negative select marker），保证筛选到的细胞都是在正确的位置发生同源重组后的突变体。就这个例子而言，就是要让突变的CFTR基因通过同源重组，即通过双交换取代相应染色体的正常CFTR基因，使细胞发生突变（既是$CFTR^-$，又具有新霉素抗性）。但是，插入片段越大，携带有新霉素抗性基因和$CFTR^-$突变体进入细胞后同其他染色体随机发生非同源区重组的概率也越大。为了获得通过正确的同源重组形成的$CFTR^-$突变体细胞，在克隆CFTR基因的载体上添加了细胞毒性序列（tk^{HSV}），这样，若是DNA插入片段较大，不仅含有CFTR，同时还带有CFTR两侧的部分，由于细胞毒性tk^{HSV}序列的存在，这种靶细胞在合适的培养基中会被杀死。单纯疱疹病毒胸腺激酶（tk^{HSV}）与正常小鼠的胸腺激酶不同，正常小鼠的胸腺激酶将9-[1，3-二羟-2-丙氧甲基]鸟嘌呤（ganciclovir，一种核苷的类似物）转变成单核苷酸类似物，而单纯疱疹病毒胸腺激酶在小鼠中则是将其转变成三磷酸的形式。因此，小鼠的ES细胞只要表达该基因的一个拷贝，便不能增殖，如果生长在含有9-[1，3-二羟-2-丙氧甲基]鸟嘌呤的培养基上，最终会死亡。这样只有那些通过同源重组接受了突变的CFTR（含有neo^r基因）基因，但又不包括侧翼的tk^{HSV} DNA序列的细胞能够在加有新霉素的培养基上生长和增殖（图2-45）。

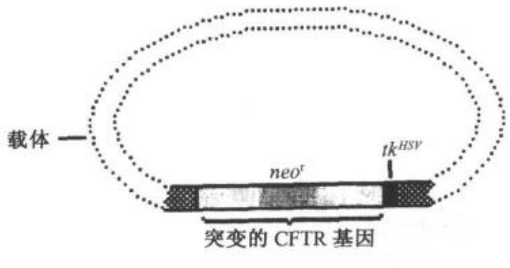


图2-45　在CFTR基因旁引入负选择标记

2.6.4.2　剔除小鼠的获得

成功获得突变的CFTR基因后，下一步就是要考虑如何得到完全丧失CFTR合成能力的剔除小鼠，其关键技术就是转基因，最好的受体是小鼠的胚胎干细胞（embryonic stem cell，ES）。

实验的第一步是从小鼠中分离具有无限分化能力的细胞，这些细胞通常称为胚性干细胞，存在于哺乳动物的囊泡中（图2-46）。囊泡是胚胎发育早期阶段出现的，由两个不同部分构成，一个是很薄的细胞外层，另一部分是细胞内层。外层是细胞的滋养层，它具有哺乳动物胚外膜的特性。滋养层的内表面同细胞基质接触的部分称为内细胞团（inner cell mass）。内细胞团是囊泡的一部分，可发育成为哺乳动物的胚胎。内细胞团中含有胚性干细胞，它能够分化成哺乳动物各种不同的组织。

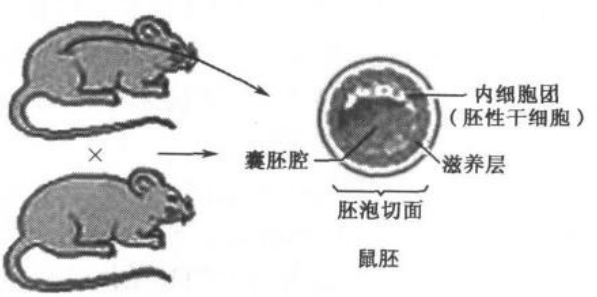


图2-46　胚性干细胞的分离

将ES分离后置于合适的培养基中培养，让其生长和增殖，然后用电激（electroporation）法将构建的CFTR DNA转染胚性干细胞。电激转移的效率一般都较低，而且通过电激进入细胞的重组DNA并非都是通过同源重组将突变的CFTR基因置换到相应染色体的正确位置上。

一般而言，在全部转染的细胞中，大约在 10^4 个细胞中有一个经历了同源重组，这种经过同源重组的细胞，它的正常基因就会被突变基因所取代，同时带有 neo^r 选择标记。因此在电激处理后将 ES 细胞转移到加有新霉素的抗性培养基上进行培养，淘汰那些没有被转化的 ES 细胞，因为未转化的细胞没有新霉素抗性基因。但是在生长的细胞中有两种类型的转化细胞，一种是通过同源重组将突变的 CFTR 正确地取代相应染色体上的正常 CFTR，这是研究所需要的。还有一类转化细胞，进入的重组 DNA 分子随机的或是通过不正确地交换将新霉素抗性基因插入到染色体上，这可通过负选择标记将它们排除，即将在新霉素抗性平板上生长的 ES 细胞转移到加有抑制剂的培养基上，由于非同源重组的染色体上有 tk^{HSV} 基因，这类细胞在这种培养基上的生长就受到抑制，这样可将正确的 CFTR 突变体选择出来。

但是，此时获得的具有 CFTR 基因突变细胞的染色体通常是杂合体，因为在一对同源染色体中，往往只有一条是重组的。

下一步是将这种 ES 细胞大量注入到新鲜的鼠胚中，使它们同胚胎中正常的 ES 细胞混合在一起，然后将这种混合的 ES 细胞的胚植入妊娠鼠的子宫。在妊娠鼠胚胎发育过程中，注射进来的 ES 细胞同孕母的囊胚细胞本身的内细胞团连成一体，形成胚性组织，这种鼠的子代就所研究的基因来说是杂合的，所以是嵌合的子代。如果注入的 ES 细胞进入子代鼠的生殖系统（能够形成配子），突变的 CFTR 基因就能够遗传给下一代。将这种具有遗传性的转基因杂合鼠与另一只同样是该基因杂合的小鼠交配，就有可能得到纯合突变基因的小鼠，这时的鼠就是完全剔除了一个正常基因的突变鼠。这样就可以利用这只纯合的 CFTR 基因突变鼠来研究 CFTR 突变给小鼠带来的影响（图 2-47）。

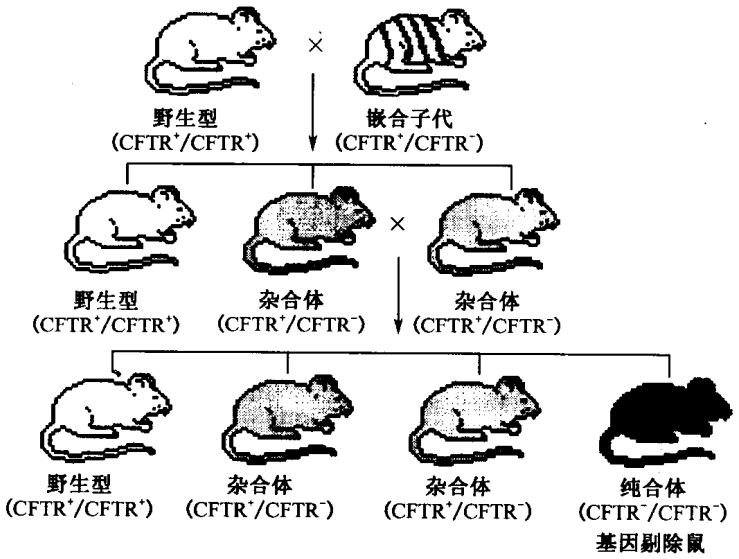


图 2-47　基因剔除鼠的获得

2.6.5　乳腺生物反应器技术

乳腺生物反应器是根据细胞生物学中蛋白质合成与分选的机理，结合基因工程技术、动

物转基因技术等，利用动物的乳腺分泌某些具有重要价值的基因产物（图 2-48）。

图 2-48　用转基因绵羊生产重要的医用蛋白质（引自 Watson *et al*., 1994）

YFG 基因编码一种具有医疗价值的蛋白质。首先将该基因置于哺乳动物启动子的控制之下，使该基因只能在哺乳动物的组织中表达。用微注射法将体外构建的含有该基因的表达载体注入绵羊卵细胞核中。然后将携带有外源基因的卵植入代孕母羊的子宫，通过 PCR 检查外源基因在孕母组织中是否进行了复制和表达。一旦表达，即可将该基因表达的蛋白质分泌到羊奶，通过收集羊奶即可分部纯化该蛋白。

乳腺生物反应器技术是一项利用细胞生物学和分子生物学的研究成果，结合基因工程技术发展起来的一项应用技术，同细胞生物学的研究有十分密切的关系。

动物生产奶蛋白并不需要什么昂贵原料，也不需要复杂的设备，不会消耗大量的能源。它们吃的是草料，是人类不直接消费的自然资源，生产的是高营养价值的动物蛋白，是大自然赋予人类的宝贵财富。

由于基因工程技术的出现，人类已可以大量取得过去只能从组织中提取的珍稀蛋白质，

用于研究或治疗疾病。可以完成这件工作的系统有细菌发酵、真核细胞培养和乳腺生物反应器等3种主要生产方式。在这3种生产方式中，乳腺生物反应器有特殊优点。乳腺生物反应器生产药品，基本上是一个畜牧业过程。

乳腺生物反应器是一项综合技术，发展乳腺生物反应器不仅需要基因工程技术，也需要动物胚胎技术，转基因技术，蛋白质提纯技术和常规畜牧技术。到目前为止，世界各国科学家已经制造出乳腺分泌各种医用蛋白质的牛、山羊、绵羊、猪和家兔，乳腺分泌的蛋白质达到可商业开发水平的转基因动物达十多种。

提　要

显微成像包括直接成像和间接成像。显微技术是细胞生物学最基本的研究技术，包括光学显微技术和电子显微技术。几种常用的光学显微镜包括普通双筒显微镜、荧光显微镜、相差显微镜、暗视野显微镜、倒置显微镜。电子显微镜是研究亚显微结构的主要工具，透射和扫描电镜是两类主要的电子显微镜。

细胞化学技术包括酶细胞化学技术、免疫细胞化学技术等。流式细胞分选技术是细胞生物学和现代生物技术中的重要技术，不仅用于分选细胞，也可分选染色体。

细胞工程技术是细胞生物学与遗传学的交叉领域，主要利用细胞生物学的原理和方法，结合工程学的技术手段，按照人们预先的设计，有计划地改变或创造细胞遗传性的技术，主要内容包括：细胞融合、细胞生物反应器、染色体转移、细胞器移植、基因转移、细胞及组织培养。

分离技术是一大类技术的总称，包括细胞组分的分离和生物大分子的分离。

本章对分子生物学方法作了简要介绍。

3 细胞质膜与跨膜运输

细胞最基本的特点就是有一层脂与蛋白质组成的膜结构包裹在最外层，在高等真核生物的细胞内由膜分隔出许多不同的区室。

由于膜很薄，无法用光学显微镜观察，直到 20 世纪 50 年代后期，由于制片和染色技术的发展，Duck 大学的 Robertson 首次在电子显微镜下观察到细胞质膜的 3 层结构，后来发现无论是动物、植物还是微生物，无论是细胞质膜还是内膜系统的膜都有着相同的超微结构。

3.1 概　　述

所谓膜（membrane）通常是指分割两个空间的一层薄薄的结构，可以是自然形成的或是人造的，有时很柔软。存在于细胞结构中的膜不仅薄，而且具有半透性（semipermeability），允许一些不带电的小分子自由通过。

3.1.1 细胞的膜结构

细胞膜（cell membrane）是细胞膜结构的总称，它包括细胞外层的膜和存在于细胞质中的膜，有时也特指细胞质膜。

细胞质膜（plasma membrane）是指包围在细胞表面的一层极薄的膜，主要由膜脂和膜蛋白所组成。质膜的基本作用是维护细胞内微环境的相对稳定，并参与同外界环境进行物质交换、能量和信息传递。另外，在细胞的生存、生长、分裂、分化中起重要作用。

真核生物除了具有细胞表面膜外，细胞质中还有许多由膜分隔成的各种细胞器，这些细胞器的膜结构与质膜相似，但功能有所不同，这些膜称为内膜（internal membrane），或胞质膜（cytoplasmic membrane）。内膜包括细胞核膜、内质网膜、高尔基体膜等。由于细菌没有内膜，所以细菌的细胞质膜代行胞质膜的作用。

习惯上把细胞所有膜结构统称为生物膜（biomembrane，或者 biological membrane），实际上它是细胞内膜和质膜的总称。生物膜是细胞的基本结构，它不仅具有界膜的功能，还参与全部的生命活动。

3.1.2 细胞膜的功能

真核细胞具有丰富的膜结构，了解膜的功能，对于理解细胞膜的结构和细胞的生命活动是十分重要的。细胞膜的结构体系和功能示于图 3-1。

界膜和区室化（delineation and compartmentalization）　　细胞膜最重要的作用就是勾画

了细胞的边界，并且在细胞质中划分了许多以膜包被的区室。作为界膜的膜结构对于细胞生命的进化具有重要意义，这种界膜不仅使生命进化到细胞的生命形式，也保证了细胞生命的正常进行，它使遗传物质和其他参与生命活动的生物大分子相对集中在一个安全的微环境中，有利于细胞的物质和能量代谢。细胞内空间的区室化，不仅扩大了表面积，还使细胞的生命活动更加高效和有序。

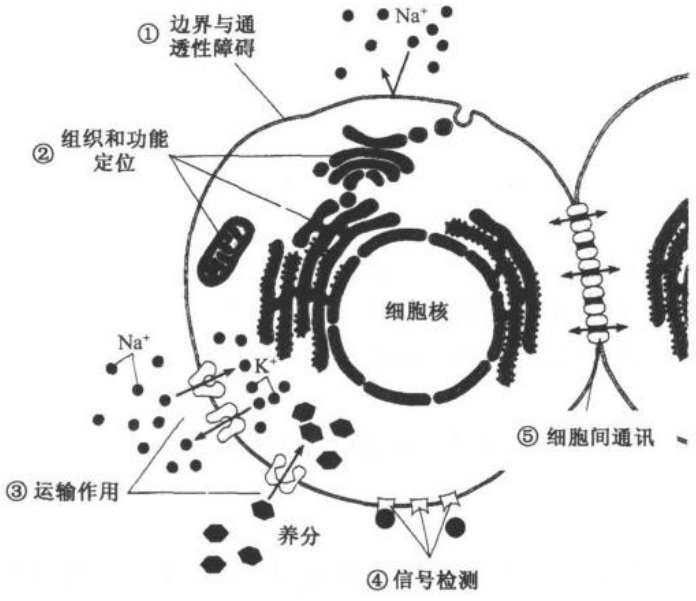


图 3-1　细胞膜的功能（引自 Becker *et al*., 1996）

调节运输（regulation of transport）　膜为两侧的分子交换提供了一个屏障，一方面可以让某些物质“自由通透”，另一方面又作为某些物质出入细胞的障碍。膜对物质的运输具有选择性，有些物质在细胞内的浓度很高，有些物质只能沿浓度梯度进入细胞，这需要通过特殊的运输机制来调节。

功能定位与组织化（localization and organization of function）　细胞膜的另一个重要功能就是通过形成膜结合细胞器，使细胞的功能定位在一定的细胞结构并组成相互协作的系统。例如细胞质中的内质网、高尔基体等膜结合细胞器的基本功能是参与蛋白质的合成、加工和运输；而溶酶体的功能是起消化作用，酸性水解酶主要集中在溶酶体。又如线粒体的内膜主要功能是进行氧化磷酸化，与该功能有关的酶和蛋白复合体集中排列在线粒体内膜上。叶绿体的类囊体是光合作用的光反应场所，所以在类囊体膜中聚集着与光能捕获、电子传递和光合磷酸化相关的功能蛋白和酶。

信号的检测与传递（detection and transmission of signal）　细胞通常用质膜中的受体蛋白从环境中接收化学信号和电信号。细胞质膜中具有各种不同的受体，能够识别并结合特异的配体，进行信号传递，引起细胞内的反应。如细胞通过质膜受体接收的信号决定对糖原的合成或分解。膜受体接收的某些信号则与细胞分裂有关。

参与细胞间的相互作用（intercellular interaction）　在多细胞的生物中，细胞通过质膜

进行细胞间的多种相互作用，包括细胞识别、细胞黏着、细胞连接等。如动物细胞可通过间隙连接，植物细胞则通过胞间连丝进行相邻细胞间的通讯，这种通讯包括代谢偶联和电偶联。

能量转换（energy transduction）　细胞膜的另一个重要功能是参与细胞的能量转换。例如叶绿体利用类囊体膜上的结合蛋白进行光能的捕获和转换，最后将光能转换成化学能储存在糖类中。同样，膜也能够将化学能转换成可直接利用的高能化合物 ATP，这是线粒体的主要功能。

细胞膜的这些基本功能也是生命活动的基本特征，膜的功能是通过其特殊化学组成和结构实现的。

3.2　红细胞膜结构

红细胞（red blood cell, erythrocyte）是结构最简单的细胞，也是研究膜结构的最好材料。人们对膜结构的认识，大多来自于对红细胞膜结构的研究。另外，由于衰老与膜成分的变化有极大的关系，所以红细胞又是研究衰老的最好材料。

3.2.1　红细胞的生物学

3.2.1.1　红细胞的形态结构

成熟的红细胞呈双面凹陷或单面凹陷的盘状(图3-2)，直径为7.5～8.3μm，厚度1.7μm，体积 8.3μm^3，表面积为 145μm^2，表面积与体积的比值较大，有利于细胞变形、气体交换和携带。

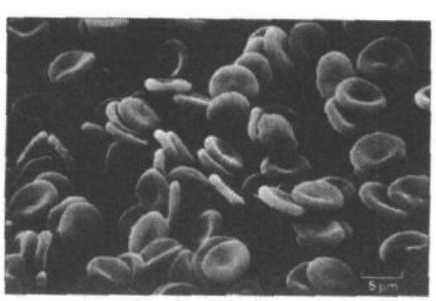


图 3-2　电子显微镜下的红细胞
（引自 Alberts *et al*., 1994）

红细胞之所以是研究膜结构的最好材料，首先是红细胞数量大，取材容易（体内的血库），极少有其他类型的细胞污染；其次，成熟的哺乳动物的红细胞中没有细胞核和线粒体等膜相细胞器，细胞质膜是它的惟一膜结构，所以分离后不存在其他膜污染的问题。

3.2.1.2　红细胞的功能

红细胞的主要功能是将肺吸进的 O_2 运送到身体的其他组织，并带走呼出的 CO_2 (图 3-3)。

红细胞对 O_2 和 CO_2 的运输与膜的性质有关。氧是一种小分子，它能够自由扩散通过红细胞质膜进入红细胞内，并被血红蛋白结合。红细胞质膜的这种性质使得红细胞能够从肺中摄取氧，因为在肺毛细管中 O_2 的压力高，O_2 就很容易透过红细胞质膜进入红细胞；又由于肺毛细管中 CO_2 的压力很低，红细胞中的 CO_2 就会释放出来。红细胞从肺组织中获得 O_2 后通过循环系统进入体组织毛细管，在体组织毛细管中由于 O_2 的压力低、CO_2 压力高，O_2 就会从红细胞中释放出来，而 CO_2 则会进入红细胞。

由于气体 CO_2 难溶于水溶液，进入红细胞后就难以溶解到红细胞的细胞质中。这要依赖

于红细胞质中的碳酸酐酶（carbonic anhydrase），它可将 CO_2 转变成水溶性的碳酸氢根阴离子（HCO_3^-）。水溶性的碳酸氢根阴离子通过红细胞质膜中的带 3 蛋白，同 Cl^- 进行交换排出红细胞，所以将带 3 蛋白称为阴离子交换蛋白。

3.2.1.3 红细胞血影

将红细胞分离后放入低渗溶液中，水很快渗入到细胞内部，使红细胞膨胀、破裂，从而释放出血红蛋白（是红细胞中惟一一种非膜蛋白），此时的红细胞就变成了没有内容物的空壳，由于红细胞质膜具有很大的变形性、柔韧性和可塑性，当红细胞的内容物渗漏之后，它的质膜可以重新封闭起来（图 3-4），此时的红细胞被称为血影（ghost），它是分离红细胞膜蛋白的最好材料。

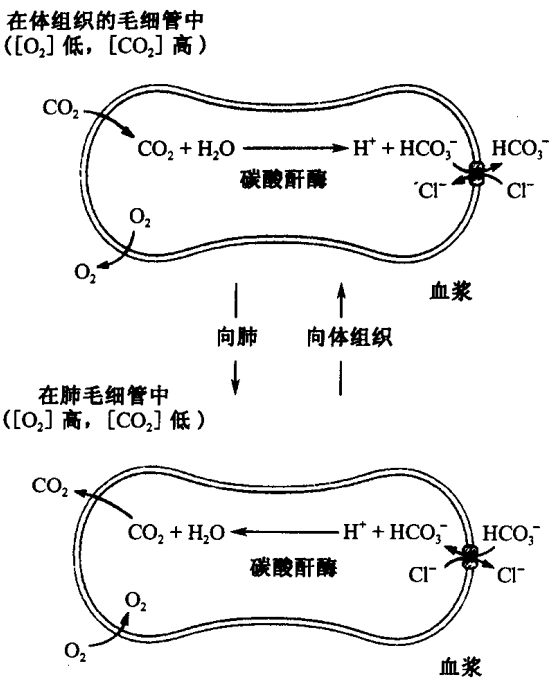


图 3-3 肌体内红细胞的运输作用
（引自 Becker *et al*., 1996）

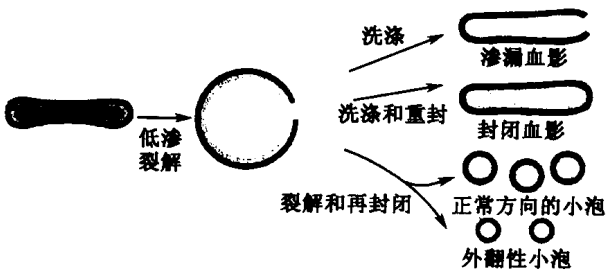


图 3-4 红细胞血影及封闭、未封闭小泡的形成（引自 Alberts *et al*., 1994）
红细胞吸水膨胀形成裂口后释放出内含物，形成开口的红细胞血影或封闭的血影。若是红细胞完全瓦解，破裂的小片也会自我封闭形成正常的小泡或外翻的小泡。

3.2.2 红细胞膜结构的研究

红细胞由于具有结构简单，生命周期长，易分离等特性，因而是生物学家很好的实验材料，特别适用于细胞膜结构的研究。

3.2.2.1 关于膜的化学组成和结构的早期研究

关于膜的化学组成和结构的研究，始于 18 世纪 90 年代，开拓者是 Overton。他意识到细胞似乎是由一层具有选择性和渗透性的外被包裹的，它只允许某些物质通过。Overton 用植物的根毛做实验，发现脂溶性物质很容易进入细胞，而水溶性的物质却不能。实际上他发现了

亲脂性（lipophilic）物质与细胞的关系。根据这一研究结果，Overton 认为在细胞的外被中有脂的存在，他还进一步推测，细胞的外被中很可能有胆固醇和卵磷脂的存在，这种推测后来被证明是完全正确的。

关于膜的化学组成和结构研究的第二个重要进展是 Langmuir 提出的脂单层（lipid monolayer）的设想。他将脂铺展在 Langmuir 水盘（Langmuir trough）的水面上，研究了脂的展层行为，发现脂在水面上形成一薄层。他用苯将脂溶解，然后将苯-脂溶液置水面上展层，当苯挥发后，留下的脂在水面上形成脂单层，亲水的头朝向水面，疏水尾背离水面（图 3-5）。脂单层概念是 20 世纪初膜结构研究的基础，导致了脂双层的发现。

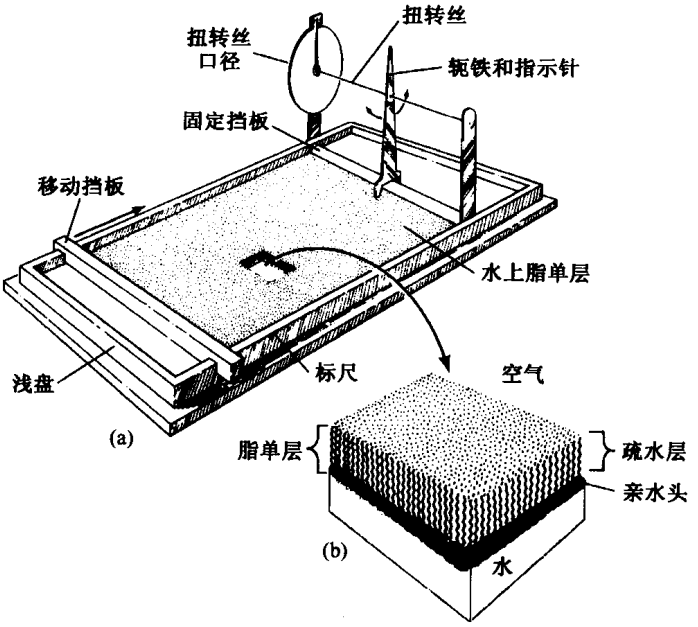


图 3-5　在 Langmuir 水盘中展现脂单层（引自 Becker *et al*., 1996）

（a）水盘由一个浅盘和一个可移动的挡板组成。移动挡板可将磷脂单层向固定挡板端挤压，形成致密的脂单层；（b）磷脂在脂单层的排列方向。

3.2.2.2　红细胞膜脂双层概念的提出

1925 年两位荷兰科学家 Gorter 和 Grendel 根据对红细胞质膜的研究首次提出质膜的基本结构是双脂分子层。这两位科学家在看到了 Langmuir 的研究论文后，认为可以用它的展层方法研究红细胞膜脂的结构，因为 Overton 已经提出在细胞的外层有脂的包被，推测红细胞的表面也有脂的存在。在红细胞的外侧包被中有多少脂尚不清楚。但是，他们在显微镜下观察到人的红细胞是扁平状，直径约为 7μm。根据红细胞的体积，他们推测红细胞的表面积约为 100μm^2。于是他们分离纯化了红细胞，并从一定数量的红细胞中抽提脂类，按 Langmuir 的方法进行展层，并比较展层后的脂单层的面积和根据体积所推算的总面积，Gorter 和 Grendel 发现用提取的脂铺展后测得的面积同实际测量的红细胞的表面积之比约为（1.8～2.2）:1，为了解释这一结果，他们提出红细胞膜的基本结构是脂双层（lipid bilayer）。他们还推测脂双层具有热力学的特点，认为极性的亲水基团朝向外侧的水性环境。它们的实验和依据实验所

得出的结论具有非常重要的意义，这是人类第一次从分子水平研究细胞膜的结构。

3.2.3 红细胞质膜

红细胞的寿命约为120d，在生存期中大约行程500 000m。在血液循环中，红细胞要穿过小于自身直径一半的微小通道（脾窦）、在脾脏内要经受氧少、低pH值等不利环境的考验、在心脏内又要受到瓣膜涡流冲击。不难想像，红细胞在这样长而艰险的运输途径中保持结构的完好，它的质膜起了重要作用。可以推测，红细胞的质膜一定有非常特别的结构，仅仅是双脂层可能难以解释。

3.2.3.1 红细胞膜骨架

研究发现红细胞质膜的内侧有一种特殊的结构，是由膜蛋白和纤维蛋白组成的网架（图3-6），它参与维持细胞质膜的形状并协助质膜完成多种生理功能，这种结构被称为红细胞膜骨架（erythrocyte membrane cytoskeleton）。

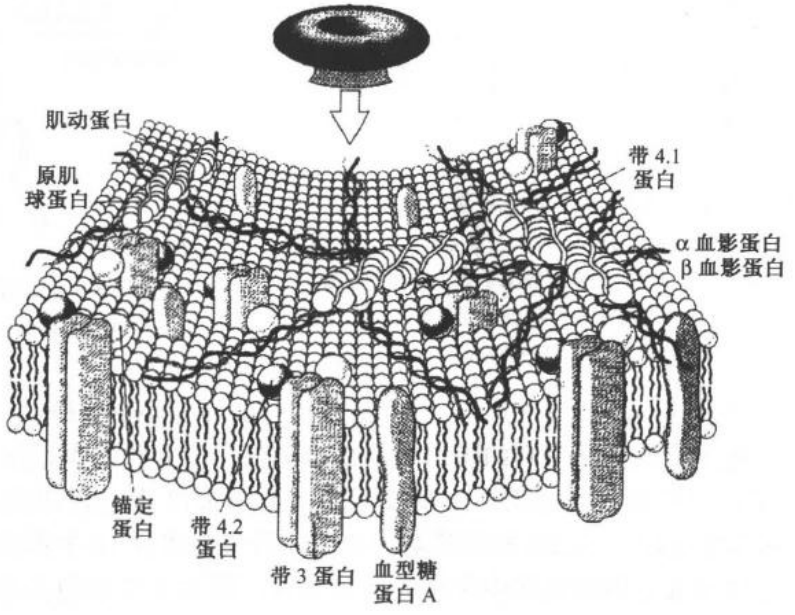


图3-6 红细胞质膜内侧的骨架结构（引自 Karp，1996）

一种红细胞质膜内表面结构的模式图，可见包埋在脂双层的整合蛋白以及与膜整合蛋白组成的膜骨架结构的排列。

红细胞的外周蛋白主要位于红细胞膜的内表面，并编织成纤维状的骨架结构，以维持红细胞的形态，并限制膜整合蛋白的移动。

3.2.3.2 红细胞膜蛋白的组成

通过单向SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析红细胞膜（含膜骨架部分）蛋白，发现大约有15种主要的蛋白带，分子质量为15kDa到250kDa（图3-7）。其中有3种主要的蛋白：血影蛋白、血型糖蛋白、带3蛋白，它们约占膜蛋白的60%以上。这3种蛋白在红细胞膜中排列方

式各不相同，代表着蛋白与膜的 3 种不同的结合方式。

血影蛋白（spectrin），又称收缩蛋白，是红细胞膜骨架的主要成分，但不是红细胞膜蛋白的成分，约占膜提取蛋白的 30%。血影蛋白属红细胞的膜下蛋白，这种蛋白是一种长的、可伸缩的纤维状蛋白，长约 100 nm，由两条相似的亚基：β 亚基（分子质量 220kDa）和 α 亚基（分子质量 200kDa）构成。两个亚基链呈现反向平行排列，扭曲成麻花状，形成异二聚体，两个异二聚体头-头连接成 200nm 长的四聚体。

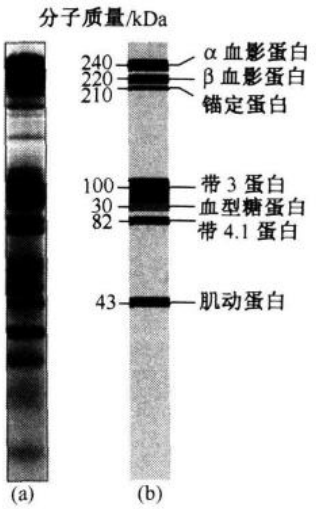


图 3-7　人红细胞膜蛋白 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分部（引自 Alberts *et al.*，1994）

（a）考马斯亮蓝染色的胶；（b）表示凝胶上主要蛋白质的位置。值得注意的是，由于血型糖蛋白含有大量负电性的糖，所以移动的速度几乎同带 3 蛋白一样慢。

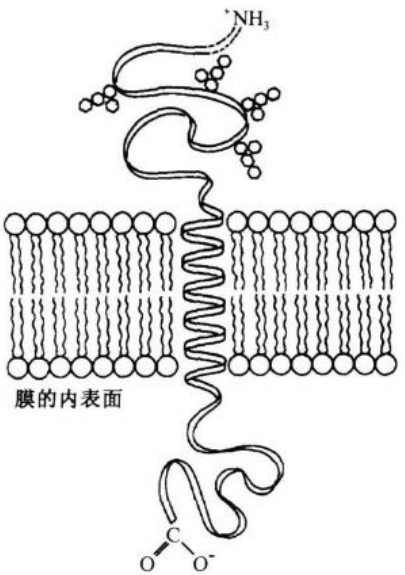


图 3-8　血型糖蛋白的结构（引自 Becker *et al.*，1996）

血型糖蛋白 A（glycophorin A），又称涎糖蛋白（sialo glycoprotein），富含唾液酸。血型糖蛋白是第一个被测定氨基酸序列的蛋白质。血型糖蛋白有几种类型，除 A 型外，还有血型糖蛋白 B、C、D，它们在红细胞膜中浓度较低。血型糖蛋白 A 是属单次跨膜糖蛋白（图 3-8），由 131 个氨基酸组成，其亲水的氨基端露在膜的外侧，结合 16 个低聚糖侧链。血型糖蛋白的基本功能可能是在它的唾液酸中含有大量负电荷，防止了红细胞在循环过程中经过狭小血管时相互聚集沉积在血管中。

带 3 蛋白（band 3 protein），与血型糖蛋白一样都是红细胞的膜蛋白，因其在 PAGE 电泳分部时位于第 3 条带而得名。带 3 蛋白在红细胞膜中含量很高，约为红细胞膜蛋白的 25%。由于带 3 蛋白具有阴离子转运功能，所以带 3 蛋白又被称为“阴离子通道”。带 3 蛋白是由两个相同的亚基组成的二聚体，每条亚基含 929 个氨基酸；它是一种糖蛋白，在质膜中穿越 12～14 次，因此是多次跨膜蛋白。

肌动蛋白（actin），又称带 5 蛋白，是细胞骨架的主要成分，在细胞骨架一章中有详细介绍。肌动蛋白纤维链长约 35nm，其中含 13 个肌动蛋白单体和一个长 35nm 的原肌球蛋白（tropomyosin）分子（由两条多肽组成，每个多肽相对分子质量为 35 000）；肌动蛋白纤维上有多个（一般为 5 个左右）与血影蛋白结合的位点，通过与血影蛋白游离端相连，参与膜骨

架结构的形成。

锚定蛋白（ankyrin），又称带2.1蛋白。锚定蛋白是一种比较大的细胞内连接蛋白，每个红细胞约含10万个锚定蛋白，相对分子质量为215 000。锚定蛋白一方面与血影蛋白相连，另一方面与跨膜的带3蛋白的细胞质结构域部分相连，这样，锚定蛋白借助于带3蛋白将血影蛋白连接到细胞质膜上，也就将骨架固定到质膜上。

带4.1蛋白（band 4.1 protein）是由两个亚基组成的球形蛋白，它在膜骨架中的作用是通过同血影蛋白结合，促使血影蛋白同肌动蛋白结合。带4.1蛋白本身不同肌动蛋白相连，因为它没有与肌动蛋白连接的位点。

内收蛋白（adducin）是由两个亚基组成的二聚体，每个红细胞约有30 000个分子。它的形态似不规则的盘状物，高5.4nm，直径12.4nm。内收蛋白可与肌动蛋白及血影蛋白复合体结合，并且通过Ca^{2+}和钙调蛋白的作用影响骨架蛋白的稳定性，从而影响红细胞的形态。

3.2.3.3 红细胞膜骨架的形成

红细胞膜骨架到底包含哪几种蛋白质？一般认为膜骨架蛋白的主要成分包括：血影蛋白、肌动蛋白、原肌球蛋白、锚定蛋白、带4.1蛋白、内收蛋白等红细胞膜细胞质面的外周蛋白。

为便于理解，可将红细胞膜骨架的网状支架的形成及与膜的结合过程大致分为三步：

首先是血影蛋白与带4.1蛋白、肌动蛋白的相互作用：血影蛋白的α和β亚基形成二聚体，在红细胞膜内，血影蛋白多以四聚体形式存在（也有六聚体、八聚体）。血影蛋白四聚体在带4.1蛋白的帮助下同肌动蛋白寡聚体结合组成骨架的基本网络。

第二步是带4.1蛋白同血型糖蛋白相互作用：带4.1蛋白的N端30kDa区在生理状态下带正电荷，而血型糖蛋白带负电荷，所以带4.1蛋白能够以静电稳定性同血型糖蛋白结合。

第三步是锚定蛋白与血影蛋白、带3蛋白的相互作用：锚定蛋白N端90kDa区可与带3蛋白结合，而72kDa区可与血影蛋白结合，由于带3蛋白是膜整合蛋白、血影蛋白是膜骨架蛋白，所以锚定蛋白起媒介作用将骨架蛋白与质膜相连。

3.3 膜的化学组成

通过对红细胞生物学特性和膜结构的研究，了解到细胞质膜的主要成分是脂，同时结合一些蛋白质，或是穿过膜，或是附着在质膜的外面。

在研究膜的化学组成时，发现细胞膜常常被脂类溶剂和蛋白酶处理后溶解，推测细胞膜的化学组成中除了脂类外还有蛋白质。例如用苯和四氯化碳等脂类溶剂作用于动物细胞，可以破坏膜；加入卵磷脂酶，也可以破坏膜，证明膜中有卵磷脂的存在。用对脂和糖都不起作用而对蛋白质有作用的多羟基苯酚处理细胞，膜结构也会遭到破坏，证明有蛋白质的存在。除了脂类和蛋白质外，细胞膜上也含有糖类。膜中蛋白质与脂的比例依据膜的类型（如质膜、内质网膜、高尔基体膜）、细胞类型（肌细胞、肝细胞）、生物类型（动物、植物和原核生物）的不同而不同（表3-1）。例如线粒体内膜的蛋白质/脂的比值比红细胞膜中蛋白质/脂的比值高得多。而蛋白质与脂的多少又与膜的功能密切相关，因线粒体内膜是电子传递链的所在地，相关蛋白都位于其中，蛋白质/脂的比值自然就很高。

一般而言，脂类约占 50%，蛋白质约占 40%，糖类约占 2%～10%，不同的膜含量不同。

表 3-1　不同生物膜中的蛋白质、脂和糖类的量

	占干重的百分比/%		
膜	蛋白质	脂	糖类
质膜			
红细胞	49	43	8
神经鞘	18	79	3
肝细胞	54	36	10
核膜	66	32	2
高尔基体	64	26	10
内质网	62	27	10
线粒体			
外膜	55	45	痕量
内膜	78	22	—
叶绿体	70	30	—

3.3.1　膜脂

生物膜上的脂类统称为膜脂（membrane lipid），其分子排列呈连续的双层，构成了生物膜的基本骨架。所有的膜脂都具有两亲性的（amphipathic），即这些分子都有一个亲水末端（极性端）和一个疏水末端（非极性端）。这种性质使生物膜具有屏障作用，大多数水溶性物质不能自由通过，只允许亲脂性物质通过。

3.3.1.1　膜脂的主要类型

膜脂是生物膜的基本组成成分，约占膜的 50%，主要有 3 大类：磷脂、鞘脂、胆固醇。

大多数膜脂都含有磷酸基团，这种脂称为磷脂（phospholipid），是细胞膜中含量最丰富和最具特性的脂。动、植物细胞膜上都有磷脂，是膜脂的基本成分，约占膜脂的 50% 以上。磷脂分子的极性端是各种磷脂酰碱基，称作头部。它们多数通过甘油基团与非极性端相连。磷脂又分为两大类：甘油磷脂和鞘磷脂。甘油磷脂包括磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱（卵磷脂）、磷脂酰肌醇等。

磷脂分子的疏水端是两条长短不一的烃链，称为尾部，一般含有 14～24 个偶数碳原子。其中一条烃链常含有一个或数个双键，双键的存在造成这条不饱和链有一定角度的扭转（图 3-9）。

磷脂烃链的长度和不饱和度的不同可以影响磷脂的相互位置，进而影响膜的流动性。各种磷脂头部基团的大小、形状、电荷的不同则与磷脂-蛋白质的相互作用有关。

鞘脂（sphingolipid）在膜中的含量较少，是鞘氨醇（sphingosine，一种含长的碳氢链的氨

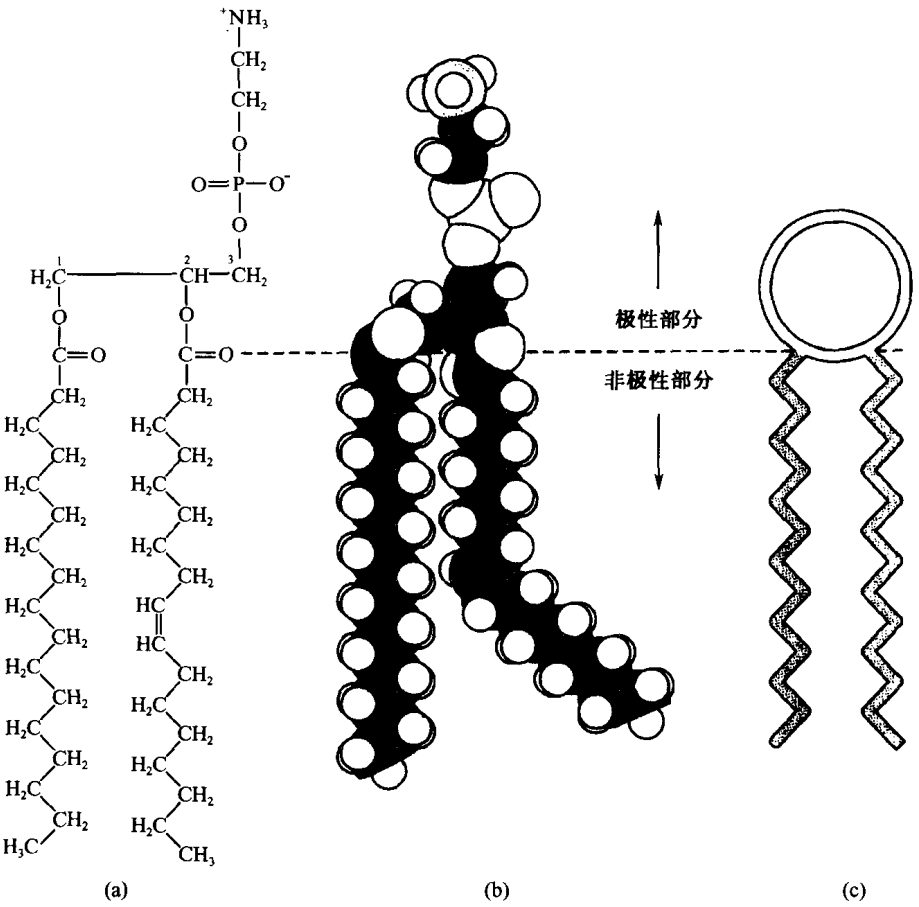


图 3-9　磷脂的结构（引自 Wolfe，1993）

（a）典型的磷脂：磷脂酰乙醇胺的分子结构；（b）磷脂酰乙醇胺的立体结构；（c）存在于膜的脂双层中脂的表示形式，主要显示极性的头和非极性的尾。

基醇）的衍生物（图 3-10）。由鞘氨醇通过它的氨基连接一个脂肪酸而成的鞘脂称为神经酰胺（ceramide）。以鞘氨醇为基础衍生的各种不同鞘脂主要是在鞘氨醇的羟基上连接不同的基团，如添加的是糖类，就是糖脂（glycolipid）。因为所有的鞘脂的一端有两个长的疏水碳链，而在另一端有一个亲水的头，所以它们具有双亲媒性，与磷脂的性质相似。

细胞膜上另一类脂是固醇类的胆固醇（cholesterol）（图 3-11），胆固醇存在于真核细胞膜中。动物细胞质膜中胆固醇的含量较高，有的占膜脂的 50%，大多数植物细胞和细菌细胞质膜中没有胆固醇，酵母细胞膜中是麦角固醇。

胆固醇分子分为 3 部分：羟基团组成的极性头部、非极性的类固醇环结构和一个非极性的碳氢尾部。胆固醇的分子较其他膜脂要小，双亲媒性也较低。胆固醇的亲水头部朝向膜的外侧，疏水的尾部埋在脂双层的中央（图 3-12）。胆固醇分子是扁平和环状的，对磷脂的脂肪酸尾部的运动具有干扰作用，所以胆固醇对调节膜的流动性、加强膜的稳定性有重要作用。

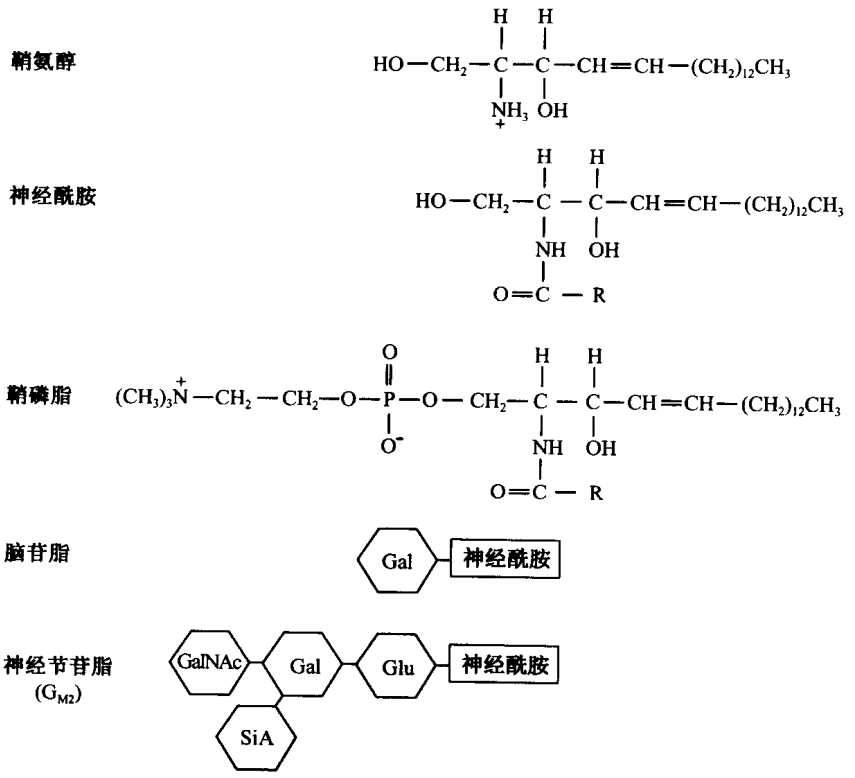


图 3-10　几种常见鞘脂的结构（引自 Karp，1996）

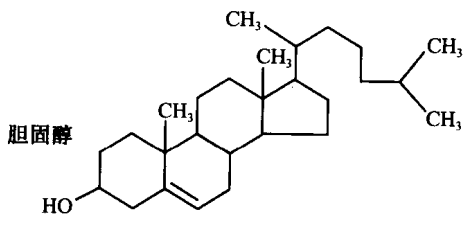


图 3-11　胆固醇的结构

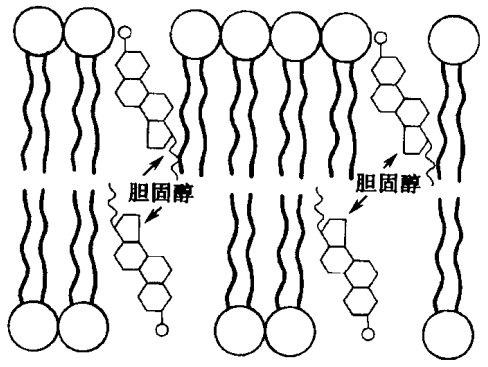


图 3-12　胆固醇在脂双层中的位置

3.3.1.2　膜脂的特性和功能

不同类型的膜含有不同类型的脂，赋予膜不同的特性。由于膜结构的多样性，估计某些生物膜含有 100 多种不同化学性质的磷脂（表 3-2）。

膜脂都是两性物质，都具有亲水的极性头和疏水的非极性的尾，大多数磷脂和糖脂在水溶液中能够自动形成双分子层结构。当这些兼性分子被水环境包围时，它们就聚集起来，将疏水的尾部埋在里面，亲水的头部露在外面与水接触。可能有两种形式：形成球状的微团（micelle），把尾部包在里面；或者形成双分子层（bilayer），把疏水的尾部夹在头部的中间。此外，

脂类双层受到损伤时，可以自动再封闭上。

表 3-2 某些生物膜膜脂的组成（脂总重量百分数）

脂	人的红细胞	人的髓鞘	牛心脏线粒体	*E. coli*
磷脂酸（PA）	1.5	0.5	0	0
磷脂酰胆碱（PC）	19	10	39	0
磷脂酰乙醇胺（PE）	18	20	27	65
磷脂酰甘油（PG）	0	0	0	18
磷脂酰丝氨酸（PS）	8.5	8.5	0.5	0
心磷脂	0	0	22.5	12
鞘磷脂	17.5	8.5	0	0
糖脂	10	26	0	0
胆固醇	22	26	3	0

虽然膜脂的结构较为简单，但是它们对膜的生物学功能具有重要的影响。有些脂能够影响某些膜蛋白的活性，决定着膜的物理状态，并且影响生物的健康状况。

物理测量表明脂双层的厚度为 6nm。由于脂总是自我形成双层结构，所以膜就没有自由的边缘，它们总是形成连续的不破裂的结构。脂的这种性质使得它们在细胞内形成了较大的网络结构。同时，也正是脂双层的伸缩性，使得细胞在运动和分裂时膜得以形变、解体和重建。脂的双层性和可塑性，也有利于细胞的融合和生殖，如在受精中，精细胞与卵细胞的结合和局部融合，就需要膜发生变化。

膜脂的主要功能是构成膜的基本骨架。去除膜脂，则使膜解体。另外膜脂也是膜蛋白的溶剂，一些蛋白通过疏水端同膜脂作用，使蛋白镶嵌在膜上得以执行特殊的功能。有研究表明，膜脂为某些膜蛋白（酶）维持构象、表现活性提供环境，一般情况下，膜脂本身不参与反应（细菌的膜脂参与反应）。膜上有很多酶的活性依赖于膜脂的存在。如果去掉脂类，酶蛋白即失去活性，加上脂类，又可使活性恢复。有些膜蛋白只有在特异的磷脂头部基团存在时才有功能。不同的脂具有不同的性质和功能，常见脂的功能列于表 3-3。

表 3-3 某些膜脂的功能

脂	存在的膜	功能
主要磷脂		
磷脂酰胆碱	存在于大多数膜中	形成脂双层，
磷脂酰乙醇胺	存在于大多数膜中	起界膜的作用，防止水
磷脂酰丝氨基	存在于大多数膜中	溶性物质的自由扩散
次要磷脂		
心磷脂	线粒体内膜	激活染色体
磷脂酰肌醇（PI）	存在于大多数膜	作为三磷酸肌醇的供体
鞘脂	大多数哺乳动物细胞，特别是神经细胞	屏障作用，激活某些酶
糖脂	叶绿体类囊体膜	屏障作用
胆固醇	大多数动物细胞膜	降低膜的渗透性，调节膜的流动性

3.3.1.3 脂质体

脂类的另一个重要的特性就是能够在水溶液中自我装配成脂双层结构（图 3-13）。例如，将少量的磷脂酰胆碱放在水溶液中，它能够自我装配成脂双层的球状结构，这种结构称为脂质体（liposome），因此，脂质体是人工制备的连续脂双层的球形脂质小囊。将脂铺展在水面上时，其极性端插入水相，非极性尾部面向空气界面。搅动后，形成极性端朝外而非极性端在内部的脂分子团，或形成双层脂分子的球形脂质体。如果将脂放在中间有挡板隔开的水中，若是在挡板中有小孔的话，那么在孔的两侧会形成平面脂双层（planar lipid bilayer）。

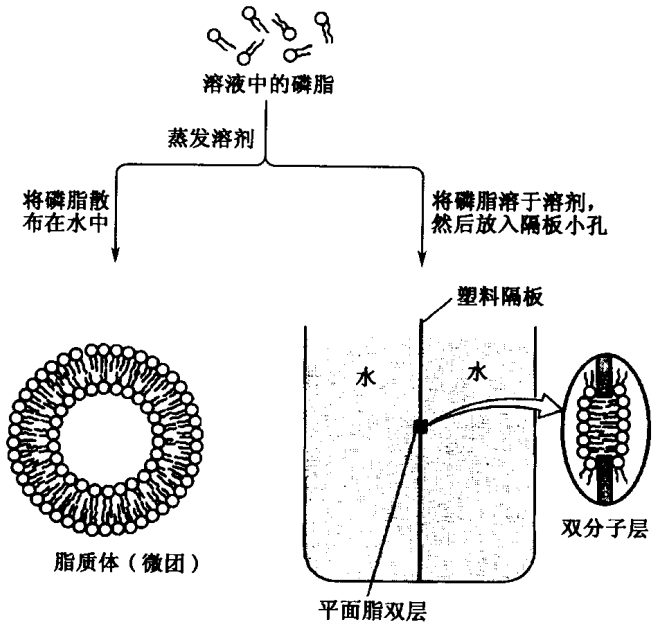


图 3-13 脂质体和平面脂双层的形成（引自 Lodish *et al*., 1995）

脂质体可作为生物膜的研究模型，并可作为生物大分子（如 DNA 分子）和药物的载体。在构建药物人工脂质体时，不仅要将被运载的分子或药物包入脂质体的内部水相，同时要在脂质体的膜上做些修饰，如插入抗体便于脂质体进入机体后寻靶。

3.3.2 膜糖

膜中的糖约占膜重量的 2%～10%，糖含量的多少依细胞的不同而不同，如红细胞膜中蛋白质占 52%、脂占 40%、糖占 8%。在 8%的糖中有 7%与膜脂共价连接在一起形成糖脂，其余 93%的糖则是同膜蛋白共价相连形成糖蛋白。应特别指出的是，细胞质膜上所有的膜糖（membrane carbohydrate）都位于质膜的外表面，内膜系统中的膜糖则位于内表面。

3.3.2.1 膜糖的种类

自然界存在的单糖及其衍生物有 200 多种，但存在于膜的糖类只有其中的 9 种，而在动物

细胞质膜上的主要是 7 种，即 D -葡萄糖（D-glucose）、D -半乳糖（D-galactose）、D -甘露糖（D-mannose）、L -岩藻糖（L-fucose）、*N* -乙酰- D -半乳糖胺（*N*-acetyl-D-galactosamine），*N* -乙酰葡萄糖胺（N-acetyl-glucosamine）、唾液酸（sialic acid）（图 3-14）。

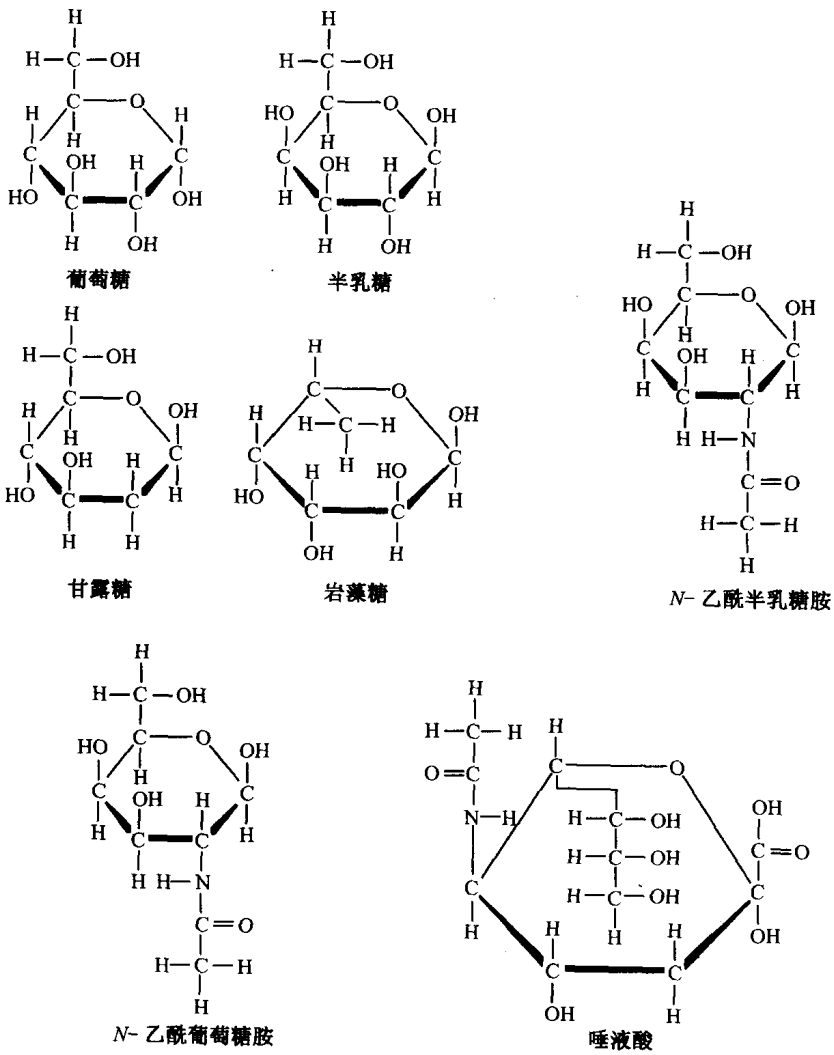


图 3-14　细胞膜中常见的 7 种糖类

3.3.2.2　膜糖的存在方式

真核细胞质膜中的糖类是通过共价键同膜脂或膜蛋白相连，即以糖脂或糖蛋白的形式存在于细胞质膜上。

在糖蛋白中，糖是以短的分支的寡聚糖形式存在，典型的糖蛋白每个支链有 15 个以下的单糖分子。唾液酸通常位于糖支链的末端，使糖链具有负电荷。糖同氨基酸的连接主要有两种形式，即 *O* -连接和 *N* -连接。

O -连接是糖链与肽链中的丝氨酸或苏氨酸残基相连，*O* -连接糖链较短，约含4个糖基。*N* -连接是糖链与肽链中天冬酰胺残基相连，*N* -连接的糖链一般有10个以上的糖基(图3-15)。另

外，*N* -连接的方式较 *O* -连接普遍。

糖蛋白是细胞膜中最为丰富的蛋白质，事实上，真核生物细胞膜上的蛋白质几乎都是糖蛋白。糖蛋白主要存在于细胞质膜上，内膜中糖蛋白极少。在动物细胞中，糖蛋白是糖萼（glycocalyx）的主要成分，而在植物细胞中，主要是由糖脂构成膜包被。内膜系统中的内质网和高尔基体是糖蛋白和糖脂的合成场所。

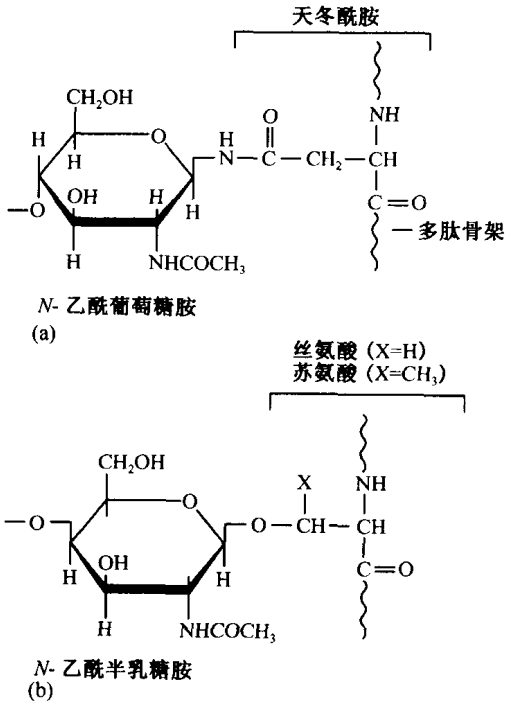


图 3-15　糖与多肽连接的两种方式

（a）*N* -连接；（b）*O* -连接。

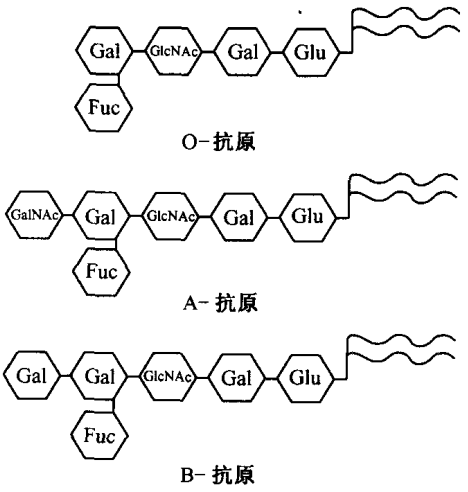


图 3-16　血型抗原

人的血型是 A 型、B 型、AB 型还是 O 型，是由红细胞膜脂或膜蛋白中的糖基决定的。A 血型的人红细胞膜脂寡糖链的末端是 *N* -乙酰半乳糖胺（GalNAc），B 血型的人红细胞膜脂寡糖链的末端是半乳糖（Gal），O 型则没有这两种糖基，而 AB 型的人则在末端同时具有这两种糖。

3.3.2.3　膜糖的功能

膜糖在细胞的生命活动中具有重要作用，它们可以提高膜的稳定性，增强膜蛋白对细胞外基质中蛋白酶的抗性，帮助膜蛋白进行正确的折叠和维持正确的三维构型。同时膜糖也参与细胞的信号识别、细胞的黏着。如同某些糖脂一样，膜蛋白中的糖基是细菌和病毒感染时的识别和结合位点。另外，糖蛋白中的糖基还帮助新合成蛋白质进行正确的运输和定位，如溶酶体的酶蛋白都有一个 6 -磷酸甘露糖的标记，这样便于被识别和被分选装入溶酶体小泡。

凝集素（lectin）是一类能与糖类特异结合的蛋白质，能使细胞发生凝集。凝集素最初是从植物种子中发现的，有些具有剧毒，因而对种子具有保护作用。有些凝集素存在于细胞表面，参与细胞间的识别。由于凝集素能与细胞表面的糖蛋白、蛋白多糖、糖脂结合，而且不同凝集素识别糖基的不同特异序列，发生特异性的结合，因此，在细胞生物学中被广泛地用于定位和分离各种含糖的细胞膜分子。

对糖脂的功能目前了解不多，知道最清楚的就是红细胞质膜中糖脂对 ABO 血型的决定作用。

ABO 血型决定子（determinant），即 ABO 血型抗原，它是一种糖脂，其寡糖部分具有决定抗原特异性的作用（图 3-16）。

ABO 血型决定子是短的、分支寡糖链，如 A 血型的人具有一种酶，这种酶能够将 *N* -乙酰半乳糖胺添加到糖链的末端；B 血型的人具有在糖链末端添加半乳糖的酶，AB 血型的人具有上述两种酶；O 血型的人则缺少上述两种酶，在抗原的末端既无 *N* -乙酰半乳糖胺，又无半乳糖。

3.3.3 膜蛋白

虽然膜脂构成膜的基本结构，但是生物膜的特定功能主要是由蛋白质决定的。膜蛋白（membrane protein）约占膜的 40%～50%，有 50 余种膜蛋白。在不同细胞中膜蛋白的种类及含量有很大差异，有的含量不到 25%，有的达到 75%。膜蛋白的分子质量也有很大差别，从 10 000到250 000。我们已讨论过的红细胞的质膜是较为简单的，只有十几种主要膜蛋白。体外培养的 HeLa 细胞的膜较为复杂，有 50 余种主要蛋白质。一般来说，功能越复杂的膜，其上的蛋白质种类越多。

3.3.3.1 膜蛋白的分类

由于膜蛋白种类多、功能复杂，对膜蛋白没有一定的分类标准，通常可根据膜蛋白的存在方式进行粗略的分类。膜蛋白在膜上的存在方式，主要是根据膜蛋白与膜脂的关系分为整合蛋白、外周蛋白、脂锚定蛋白。

整合蛋白（integral protein），又称内在蛋白（intrinsic protein）、跨膜蛋白（transmembrane protein），部分或全部镶嵌在细胞膜中或内外两侧，以非极性氨基酸与脂双分子层的非极性疏水区相互作用而结合在质膜上。实际上，整合蛋白几乎都是完全穿过脂双层的蛋白质（图 3-17），亲水部分暴露在膜的一侧或两侧表面；疏水区同脂双分子层的疏水尾部相互作用；整合蛋白所含疏水氨基酸的成分较高。跨膜蛋白可再分为单次跨膜、多次跨膜、多亚基跨膜等。跨膜蛋白一般含 25%～50%的 α 螺旋，也有 β 折叠，如线粒体外膜和细菌质膜中的孔蛋白就是 β 折叠。

外周蛋白（peripheral protein），又称附着蛋白（attachment protein）。这种蛋白完全外露

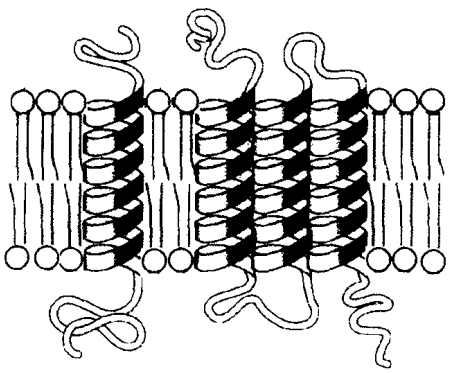


图 3-17 整合蛋白（引自 Karp，1999）

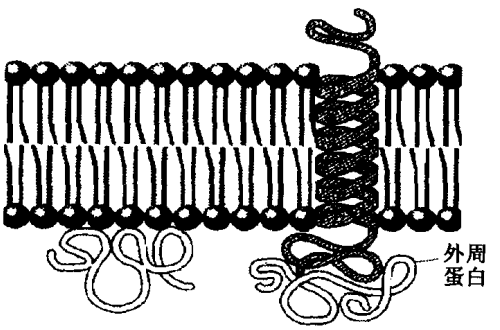


图 3-18 外周蛋白（引自 Karp，1999）

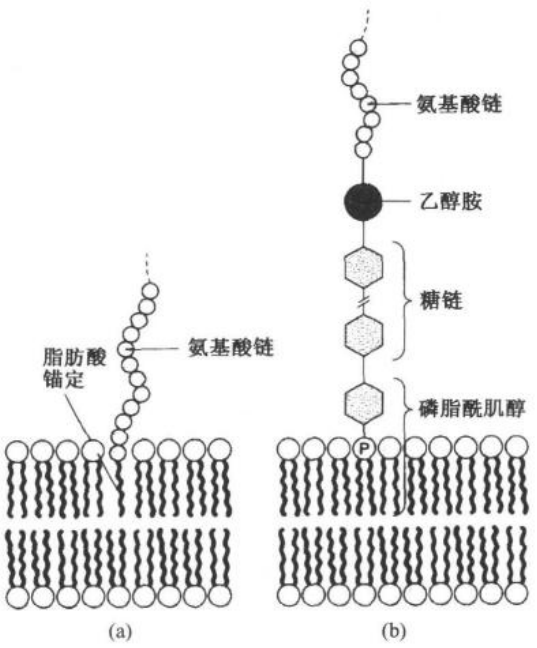


图 3-19　脂锚定蛋白（引自 Wolfe，1993）
（a）通过脂肪酸将蛋白质锚定在质膜上；（b）通过糖链将蛋白质锚定在质膜上。

在脂双层的内侧或外侧，主要是通过非共价键附着在脂的极性头部，或整合蛋白亲水区的一侧，间接与膜结合（图 3-18）。

外周蛋白可用高盐或碱性 pH 条件分离。实际上，有时外周蛋白与整合蛋白是难以区分的，因为许多膜蛋白是由多亚基组成的，其中有的亚基插入在脂双层，有的亚基则是外周蛋白。

外周蛋白为水溶性，占膜蛋白总量的 20%～30%，在红细胞中占 50%，如红细胞的血影蛋白和锚定蛋白都是外周蛋白。外周蛋白可以增加膜的强度。

脂锚定蛋白（lipid-anchored protein）又称脂连接蛋白（lipid-linked protein），通过共价键的方式同脂分子结合，位于脂双层的外侧。主要有两种结合方式，一种是蛋白质直接结合于脂双分子层，另一种方式是蛋白质并不直接同脂双层结合，而是通过一个糖分子间接同脂双层结合（图 3-19）。

通过与糖的连接被锚定在膜脂上的蛋白质主要是通过短的寡糖与包埋在脂双层外叶中的糖基磷脂酰肌醇（glycosyl-phophatidyl ionositol，GPI）相连而被锚定在质膜的外侧。之所以能够在膜上发现这类脂锚定蛋白，是因为用特异识别和切割含有肌醇磷脂的磷脂酶处理细胞膜能释放出蛋白质。这类脂锚定蛋白通常是膜受体、酶和细胞黏着分子。一种很少见的贫血——阵发性血红蛋白夜尿就是 GPI 合成缺陷，导致红细胞容易破裂所至。

另一类存在于细胞质面的脂锚定蛋白是直接通过与脂双层中的碳氢链形成共价键进行锚定的。目前至少发现两种蛋白（Src 和 Ras）是通过这种方式被锚定在质膜的细胞质面，提示这种锚定方式与细胞从正常状态向恶性状态转化有关。

3.3.3.2　膜蛋白的功能

细胞质膜有着许多重要的生物学功能，这些功能大多数是由膜蛋白来执行的。膜蛋白中

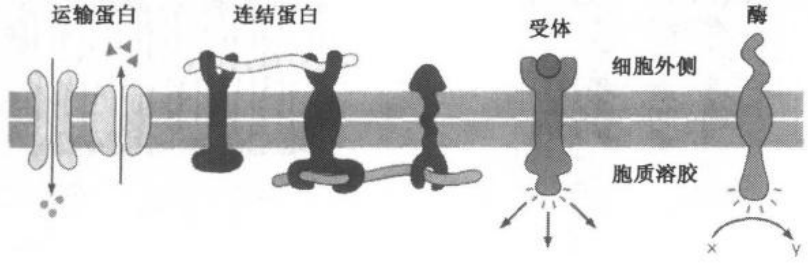


图 3-20　膜蛋白的某些功能（引自 Alberts *et al*.，1994）

有些是运输蛋白，转运特殊的分子和离子进出细胞；有些是酶，催化与酶相关的代谢反应；有些是连接蛋白，起连接作用；还有些是受体，起信号接收和转导作用等（图 3-20，表 3-4）。

表 3-4　某些膜蛋白及其功能

功能蛋白	示例	作用方式
运输蛋白	Na^+-K^+泵	主动将 Na^+ 泵出细胞，将 K^+ 泵入细胞
连接蛋白	整联蛋白	将细胞内肌动蛋白与细胞外基质蛋白相连
受体蛋白	血小板生长因子（PDGF）受体	同细胞外的 PDGF 结合、在细胞质内产生信号，引起细胞的生长与分裂
酶	腺苷酸环化酶	在细胞外信号作用下，使细胞内产生 cAMP

3.3.3.3　膜蛋白的研究方法

膜蛋白的分离

要研究膜蛋白的功能，最好是先分离膜蛋白，然后进行功能研究。由于整合蛋白是双亲媒性分子，所以很难以水溶液的形式分离整合蛋白。用去垢剂分离小的跨膜蛋白，是分离膜蛋白的常用方法。

去垢剂（detergent）可分为离子型和非离子型两种。十二烷基磺酸钠（SDS）是常用的离子型去垢剂，它不仅可使细胞膜崩溃，并与膜蛋白的疏水部分结合使其分离，而且还破坏膜蛋白内部的非共价键，使蛋白质变性，故此不宜用于分离膜蛋白。Triton X-100 是常用的温和性去垢剂，它可以使膜脂溶解，又不会使蛋白质变性（图 3-21）。

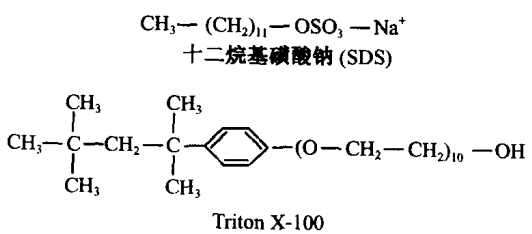


图 3-21　去垢剂 SDS 和 Triton X-100 的分子结构

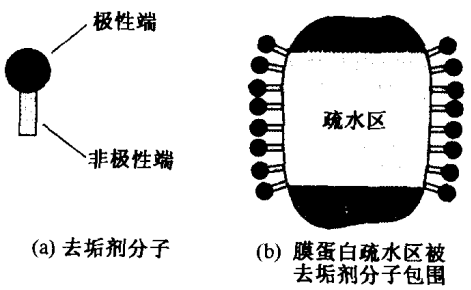


图 3-22　去垢剂在膜蛋白分离中的作用（引自 Lodish *et al*., 1995）

（a）去垢剂分子，具有极性和非极性端；（b）去垢剂包裹在膜蛋白的疏水区，极性区朝向外侧，使蛋白质成为水溶性，从而与膜分离。

去垢剂是一种一端亲水一端疏水的双亲媒性分子，它们具有极性端和非极性的碳氢链，当它们与膜蛋白作用时，可以用非极性端同蛋白质的疏水区作用，取代膜脂，极性端指向水中，形成溶于水的去垢剂-膜蛋白复合物，从而使膜蛋白在水中溶解、变性、沉淀（图 3-22）。

膜蛋白在膜中位置测定

如何检测跨膜蛋白的哪一部分位于细胞的外侧，哪一部分位于细胞的内侧？可以通过非通透性的试剂对蛋白质进行标记或修饰实验进行测定。实验中如果用蛋白水解酶处理完整的

细胞进行膜蛋白的测定，应该选用因分子质量过大而不能透过细胞膜的蛋白酶，如胰蛋白酶（图 3-23 的上面部分），这种处理可以将跨膜蛋白的朝向外侧的肽水解，而位于脂双层和细胞质面的部分则不受影响。

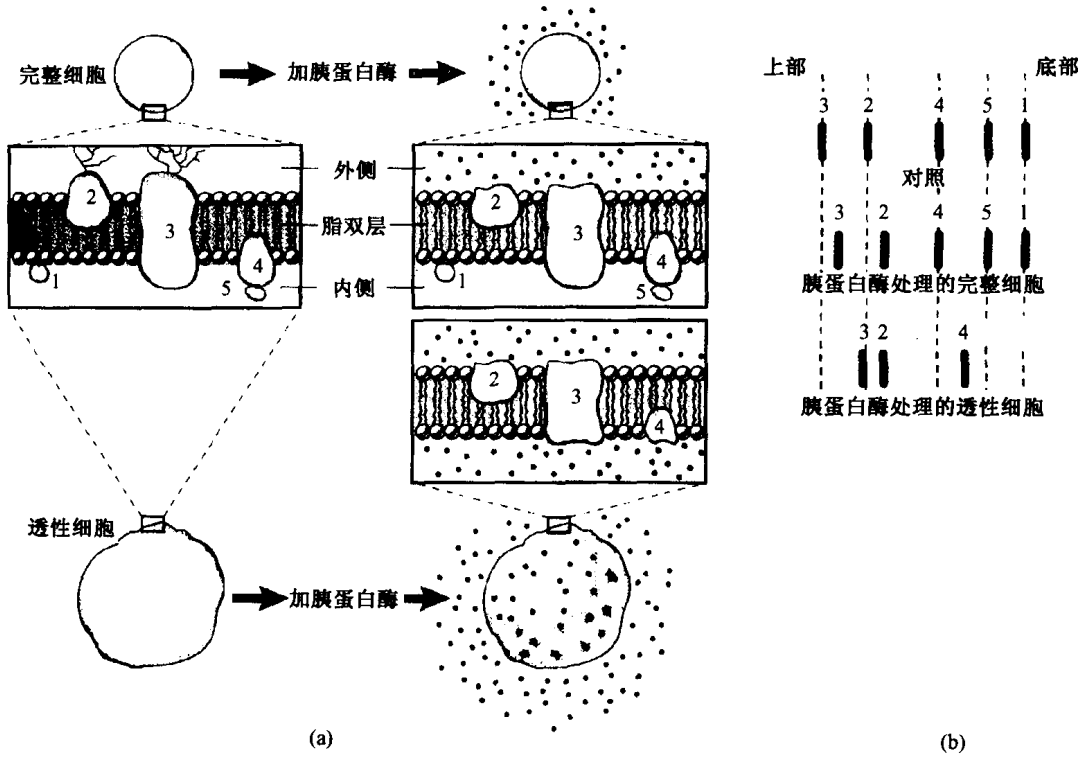


图 3-23　测定膜蛋白在膜中定位的实验过程（引自 Karp, 1999）

(a) 用不能透过细胞质膜的胰蛋白酶处理完整的细胞，膜蛋白 2 和 3 的细胞外侧部分被水解；如果先提高细胞质膜的通透性，再用胰蛋白酶处理，则膜内侧的外周蛋白 1 和 5 被完全水解，锚定蛋白 4 被部分水解。(b) 显示 (a) 中各处理细胞的膜蛋白 SDS－聚丙烯酰胺凝胶电泳的带型。

处理的结果可以通过 SDS－聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测。为了测定朝向细胞质面的膜蛋白部分，可以用非离子去垢剂或渗透休克提高膜的渗透性。在这些条件下，膜失去对蛋白水解酶渗透的障碍作用，膜蛋白的细胞质部分也就可以被蛋白酶水解（图 3-23）。

膜蛋白的功能测定

为了测定膜蛋白的功能，可以利用脂质体法。上面我们已经讨论过可以用温和性去垢剂，如 Triton X-100，使膜脂溶解，分离到有生物功能的膜蛋白。另外，可以利用人工脂质体研究膜蛋白的功能。如果在制备人工脂质体时，加入纯化的膜蛋白，膜蛋白就会插入到脂质体中，然后可研究膜蛋白的功能。有人用这种方法研究了膜中 Na^+/K^+-ATPase 的功能（图 3-24）。

实验中首先用去垢剂溶解膜蛋白，然后进行蛋白质的分离纯化，再将分离的膜蛋白与适当的磷脂混合，并用透析法除掉去垢剂，就可形成脂质体小泡。如果分离的膜蛋白是 Na^+/K^+-ATPase 的成分，这些重建的小泡在 Mg^{2+} 和 ATP 的存在下，可进行 Na^+/K^+ 的主动运输，通过对脂质体内外 Na^+ 和 K^+ 浓度的测定即可确定加入到人工脂质体上的蛋白是否是 Na^+/K^+-ATPase。

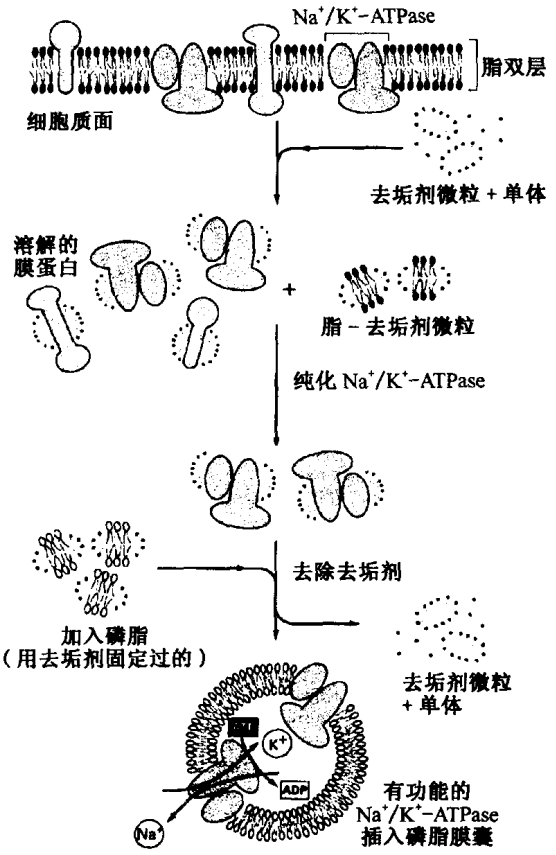


图 3-24　利用脂质体研究膜蛋白的功能（引自 Alberts *et al*., 1994）

图中所示是用温和去垢剂溶解，然后纯化，最后重建有功能 Na^+/K^+-ATPase 的实验过程。实验中要分离纯化 Na^+/K^+-ATPase，然后将它掺入到磷脂小泡（脂质体）。

3.4　膜的分子结构及特点

细胞的各种结构同它们相应的功能是一致的。由于细胞的生活物质被包裹在细胞质膜内，而细胞的新陈代谢活动必须同细胞外物质间进行交换，这就要求细胞质膜具有特殊的结构，以保证生命活动的正常进行。

3.4.1　结构模型

关于膜结构的研究从 19 世纪末就开始了。1890 年，Overton 发现了脂溶性物质容易透过细胞，提出了脂肪栅的膜结构设想。1925 年，荷兰的两位科学家 Gorter 和 Grendel 根据对红细胞的研究，提出细胞的外面有一个双脂分子层结构。但是，这些研究工作只是认识到膜脂的存在，并没有将蛋白质与膜的功能真正联系起来。直到 1935 年，人们才真正认识到膜蛋白的存在，提出膜脂和膜蛋白的结构模型。

3.4.1.1 片层结构模型

膜的脂双层结构的提出，解释了关于细胞的一些基本特点的原因，但是不能解释膜的一些重要性质，特别是溶质渗透性（solute permeability）和电抗性（electrical resistance），而溶质对膜的渗透性主要与溶解性相关。例如葡萄糖很容易进入大多数细胞，虽然半乳糖的大小、形态与葡萄糖相似，但却难以进入细胞。这种渗透性的差异，细胞是如何控制的？当时的生物学家难以认识清楚，但他们已经认识到细胞对底物的识别似乎与膜的透性差异相似。于是生物学家开始猜想，膜上是否有类似于酶的结合位点同葡萄糖结合并促进葡萄糖进入细胞？当时还发现，生物膜对离子的透性比人工脂双层要容易，如 1 小时透过红细胞的 K^+ 的量相当于 1 天透过人工脂双层的 K^+ 的量。

为了研究膜透性差异的原因，Danielli 和 Davson 进行了一系列的研究，主要是测量甘油三酯在水中的表面张力，并与细胞的表面张力相比较。由于甘油三酯是完全疏水的油性分子，将甘油三酯置于水中就形成了球形油滴，同水接触的面积非常小，说明油滴的表面张力相当高。于是，他们推测，如果活细胞的表面都是由脂肪构成的脂双层，那么表面张力就应该与油滴相似。但测量的结果要低得多，说明膜并非只是由脂肪构成的。他们在实验中还发现，在油滴中加些蛋白质，可使油滴的表面张力降至活细胞表面张力相同的水平。

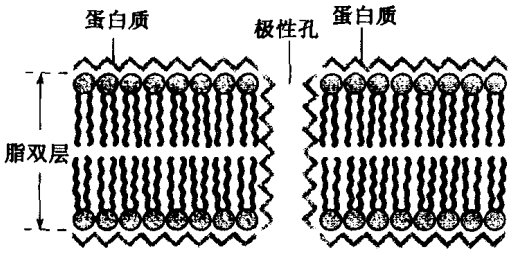


图 3-25 Danielli-Davson 片层膜结构模型
（引自 Wolfe，1993）

根据这些实验结果，1935 年 Danielli 和 Davson 提出“双分子片层”结构模型，或三明治式模型。他们认为膜的骨架是脂肪形成的脂双层结构，但是，为了降低活细胞的表面张力，他们假定在脂双层的内外两侧都有一层蛋白质包被，即蛋白质-脂-蛋白质的三层结构，内外两层的蛋白质层都非常薄。他们还认为，蛋白层是以非折叠、完全伸展的肽链形式包在脂双层的内外两侧。这一模型提出后，很快又进行了一些细微的修改，认为在膜上有一些二维伸展的孔，孔的表面也是由蛋白质包被的，这样孔就具有极性，提高了水对膜的通透性。图 3-25 所示的是 Danielli 和 Davson 于 1954 年最后修改的片层结构模型（lamella structure model）。

该模型是第一次用分子术语描述的膜结构，并将膜结构同所观察到的生物学性质联系起来，对后来的研究有很大的启发。

3.4.1.2 单位膜模型

1959 年，Robertson 利用电子显微镜技术对各种膜结构进行了详细研究，在电子显微镜下发现细胞膜是类似铁轨结构（railroad track），两条暗线被一条明亮的带隔开，显示暗-明-暗的三层，总厚度为 7.5nm，中间层为 3.5nm，内外两层各为 2nm。并推测：暗层是蛋白质，透明层是脂，建议将这种结构称为单位膜（图 3-26）。

单位膜模型（unit membrane model）是在片层结构模型的基础上发展起来的另一个重要模型，它与片层结构模型有许多相同之处，最重要的修改是膜脂双分子层内外两侧的蛋白质

存在的方式不同。单位膜模型强调的是蛋白质为单层伸展的 β 折叠片状，而不是球形蛋白。另外，单位膜模型还认为膜的外侧表面的膜蛋白是糖蛋白，而且膜蛋白在两侧的分布是不对称的。这一模型能够解释细胞质膜的一些基本特性，如质膜有很高的电阻，这是由于膜脂的非极性端的碳氢化合物是不良导体的缘故；再如由于膜脂的存在，使它对脂溶性强的非极性分子有较高的通透性，而脂溶性弱的小分子则不易透过膜。

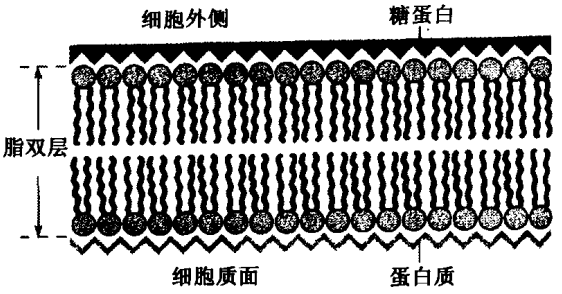


图 3-26　Robertson 的单位膜结构模型
（引自 Wolfe，1993）

单位膜模型也有一些不足：首先该模型把膜看成是静止的，无法说明膜如何适应细胞生命活动的变化；其二，不同的膜其厚度不都是 7.5nm，一般在 5～10nm 之间；其三，如果蛋白质是伸展的，则不能解释酶的活性同构型的关系。还有，该模型也不能解释为什么有的膜蛋白很容易被分离，有些则很难。

3.4.1.3　流动镶嵌模型

1966 年，Lenarnard 和 Singer 发现膜蛋白的氨基酸链中有 30% 是以 α 螺旋的形式弯曲存在，而不像片层结构模型那样完全伸展在两侧。若将膜蛋白展开后铺展在膜的外层，其厚度是 7～8nm 的几倍，显然与所观察的结果不符。另外，从 Singer 的观察，如果蛋白质是完全伸展，则需要消耗大量的能量以维持疏水氨基酸暴露在水性环境中，事实上蛋白质总是倾向于折叠，让亲水和疏水的不同基团处于不同的环境中，以维持最低的能量状态。

一些研究者发现磷脂在水中的行为都是趋向形成脂双层，并且都是将亲水的基团朝向表面，这种排列方式会降低表面张力，因而不需要蛋白质包被。在科学研究中常常会发生这样的情况：依据是错误的，但结论却是正确的，Danielli 和 Davson 根据甘油三酯的实验，认为蛋白质在膜中是非常重要的，但这种重要性并非是降低膜脂的表面张力。

20 世纪 60 年代发展起来的冰冻蚀刻技术，首次揭示了膜中有蛋白质颗粒存在。

1972 年 Singer 和 Nicolson 总结了当时有关膜结构模型及各种研究新技术的成就，提出了流动镶嵌模型（fluid mosaic model），保留了单位膜模型中有关脂双分子层的正确概念，但对蛋白质的存在状态进行了较大的修改，认为球形膜蛋白分子以各种镶嵌形式与脂双分子层相结合，有的附在内外表面，有的全部或部分嵌入膜中，有的贯穿膜的全层，这些大多是功能蛋白（图 3-27）。

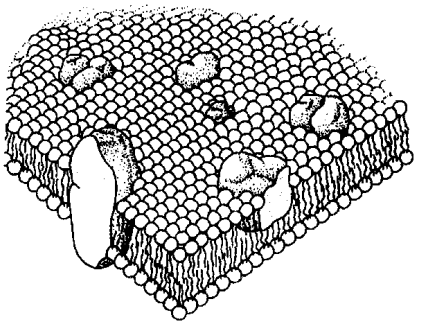


图 3-27　Singer-Nicolson 的流动镶嵌模型
（引自 Karp，1996）

流动镶嵌模型有两个主要特点。其一，蛋白质不是伸展的片层，而是以折叠的球形镶嵌在脂双层中，蛋白质与膜脂的结合程度取决于膜蛋白中氨基酸的性质。第二个特点就是膜具有一定的流动性，不再是封闭的板块结构，以适应细胞各种功能的需要。

流动镶嵌模型最高明之处就是认识到不同的膜蛋白

与膜脂的亲和性是不同的，因而影响膜蛋白在膜中的位置，即膜蛋白与膜脂的作用方式。整合膜蛋白具有一个或多个疏水区，与脂双层内部的疏水区具有亲和力，因而这些蛋白与膜脂结合较紧而不易除去。然而，这些整合蛋白也有一个或多个亲水区，使它们伸向膜外，进入膜两侧的水相。另一类膜蛋白——外周蛋白，缺少疏水区，因而不能插入脂双层，但是能够通过弱的静电作用同膜脂的亲水头结合或是与整合蛋白的亲水区结合，因此外周蛋白较容易从膜中分离，并且可以溶于盐溶液而不需用去垢剂处理。

流动镶嵌模型强调了膜的流动性和不对称性，较好地体现细胞的功能特点，被广泛接受，也得到许多实验的支持。后来又发现糖类是以糖脂或糖蛋白的形式存在于膜的外侧表面。图3-28是现今广为接受的生物膜结构模型。

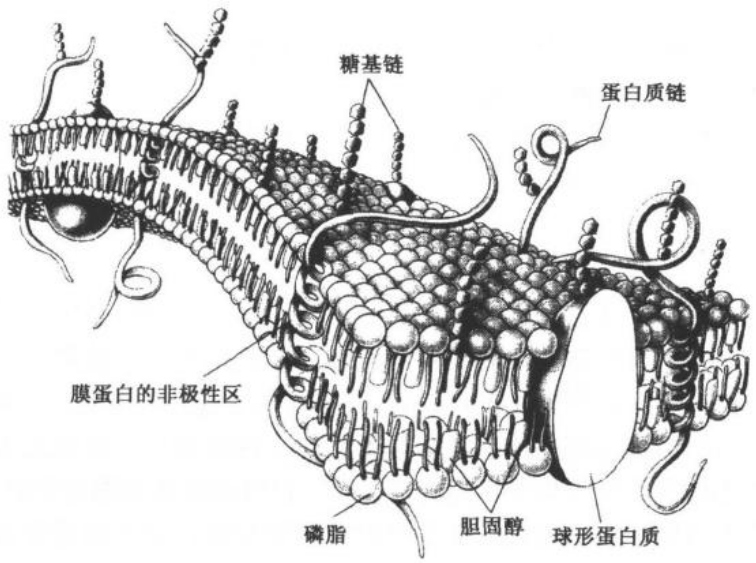


图 3-28　由流动镶嵌模型发展而来的生物膜结构模型（引自 Raven，1996）

3.4.1.4　大肠杆菌细胞质膜

流动镶嵌模型同样适合原核生物。但是革兰氏阴性菌，如大肠杆菌的细胞质膜是双层的

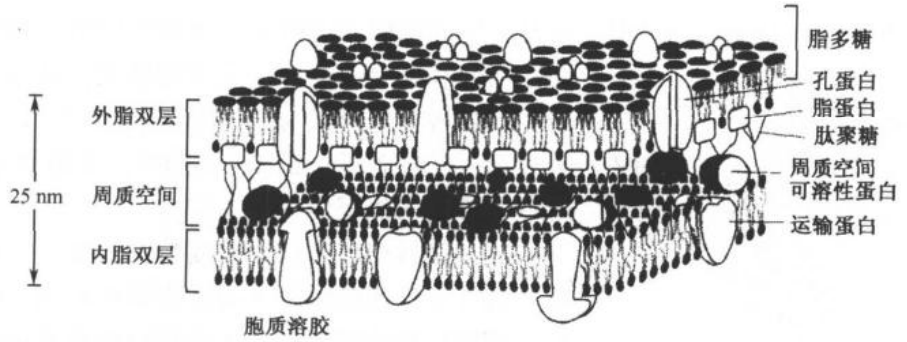


图 3-29　*E. coli* 的双层膜结构模式图（引自 Alberts *et al*.，1994）

内膜是细胞质膜。在内外脂双层之间，是细菌的细胞壁，主要成分是肽聚糖，肽聚糖是由蛋白质和多糖构成的，附着在外膜的脂蛋白上。

膜结构（图 3-29）；对于革兰氏阳性菌，如链球菌、葡萄球菌等只有一层细胞膜结构。

真核生物的细胞质膜中没有孔蛋白（porin），但是在革兰氏阴性菌的外膜上存在丰富的孔蛋白。

孔蛋白也存在于线粒体和叶绿体的外膜上，性质与革兰氏阴性菌的孔蛋白类似，但是它们允许较大的分子通过，其中线粒体孔蛋白可通过分子质量为 6kDa 的分子，而叶绿体的孔蛋白则可通过分子质量在 10kDa 到 13kDa 之间的分子。

孔蛋白是膜整合蛋白，它的膜脂结合区与其他的跨膜蛋白不同，不是 α 螺旋，而是 β 折叠（图 3-30）。

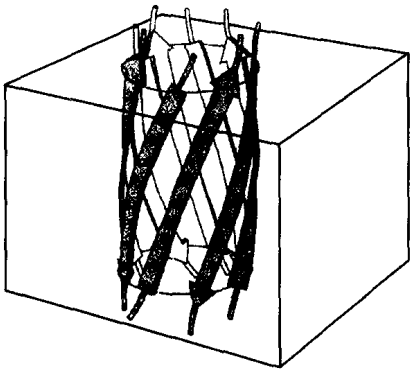


图 3-30　细菌的孔蛋白以 β 折叠形式与质膜的脂双层作用（引自 Wolfe，1993）

3.4.2　膜不对称性

流动镶嵌模型的一个主要特点就是体现了膜不对称性（membrane asymmetry）。细胞膜的不对称性是指细胞质膜中各种成分的分布是不均匀的，包括种类和数量的不均匀。

3.4.2.1　不对称性的表现

膜的主要成分是蛋白质、脂和糖，膜的不对称性主要是指这些成分分布的不对称以及这些分子在方向上的不对称。

膜脂的不对称性　膜脂的不对称性表现在膜两侧分布的各类脂的含量比例不同，各种细胞的膜脂不对称性差异很大。由于膜脂在两侧分布的差别，造成不同膜区的功能各异。例如在红细胞膜脂双层中，在外叶含鞘磷脂、磷脂酰胆碱较多，而在内叶含磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸较多（图 3-31）。

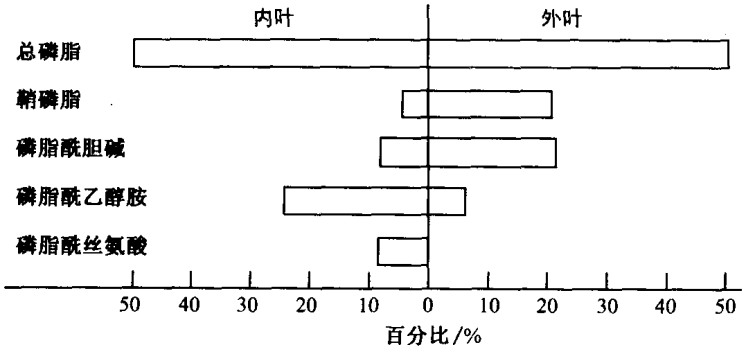


图 3-31　人红细胞膜中几种磷脂的不对称分布

膜蛋白的不对称性　膜蛋白的分布是绝对不对称的，每种膜蛋白在膜内都有特定的排布方向。例如红细胞的血型糖蛋白分子伸向膜内侧面与伸向外侧面的氨基酸残基的数目不对

称。血影蛋白分布在红细胞膜的内侧面。一般说，细胞质面的蛋白质比外表面少，一些酶和受体处于膜的外表面，如 5′-核苷酸酶、磷酸脂酶、Mg^{2+}-ATP 酶、激素受体、生长因子受体等。腺苷酸环化酶则是处于膜的内表面。

膜糖的不对称性　糖脂均分布在动物细胞的外表面。图 3-32 显示的是人红细胞的糖脂和磷脂分布的不对称性。

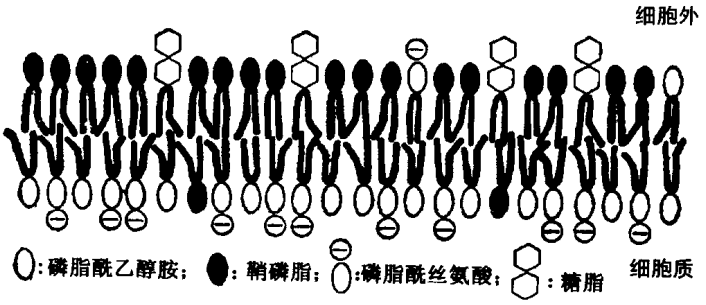


图 3-32　人红细胞膜的脂双层中磷脂与糖脂的不对称分布（引自 Arberts *et al*., 1994）
图中可见糖脂都是位于脂双层的外叶。

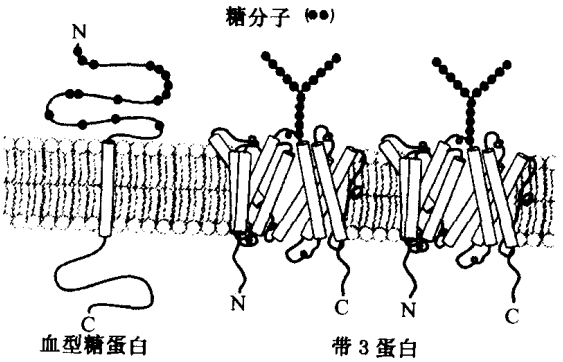


图 3-33　膜糖分布的不对称性

另外，糖蛋白的糖基在质膜上也是分布于质膜脂双层的外叶。如血型糖蛋白、带 3 蛋白（图 3-33）等。

3.4.2.2　不对称性的意义

膜脂、膜蛋白及膜糖分布的不对称性导致了膜功能的不对称性和方向性，保证了生命活动的高度有序性。

膜脂在膜中的分布是不对称的，但这种不对称性的生物学作用目前还了解得很少，但也取得了一些进展。如糖脂是位于脂双层的外侧，其作用可能是作为细胞外配体（ligand）的受体；磷脂酰丝氨酸主要集中在脂双层的内叶，在生理 pH 下带负电荷，这种带电性使得它能够同带正电的物质结合，如可与血型糖蛋白 A 跨膜 α 螺旋邻近的赖氨酸、精氨酸结合；磷脂酰胆碱出现在衰老的淋巴细胞外表面，作为被吞噬细胞吞噬的信号；磷脂酰胆碱也出现在血小板的外表面，此时作为血凝固的信号；磷脂酰肌醇主要集中在内叶，它们在将细胞质膜的刺激向细胞质传递中起关键作用。

膜不仅内外两侧的功能不同，不同区域的功能也不相同，造成这种功能上的差异主要是膜蛋白、膜脂和膜糖分布不对称引起的。

细胞间的识别、运动、物质运输、信号转导等都具有方向性，这些方向性的维持则依赖于膜蛋白、膜脂和膜糖的分布不对称性。

3.4.2.3 不对称性的研究方法

研究膜结构的不对称性的方法有很多种，其中最重要的就是冷冻断裂技术。此外还有同位素标记法、酶水解法等。

冷冻断裂法

在第二章已经详细介绍了冷冻断裂（freeze fracture）法的实验过程，这里只是简单地介绍在膜研究中的应用。冷冻断裂法不仅可用于研究膜组分分布的不对称，也是膜的脂双层结构的直接证据来源。图 3-34 是用冷冻断裂法所观察到的膜结构不对称性的示意图。

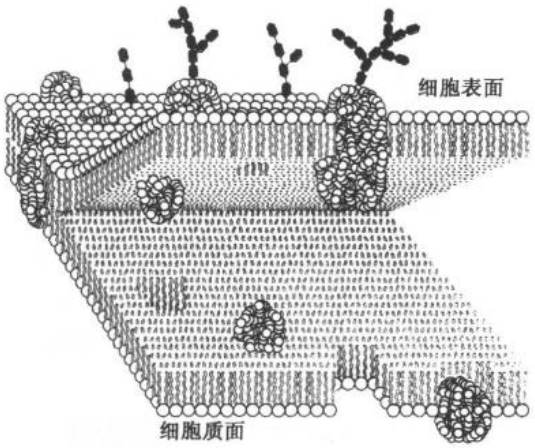


图 3-34 冷冻断裂显示的脂双层及膜蛋白分布的不对称（引自 Wolfe，1993）

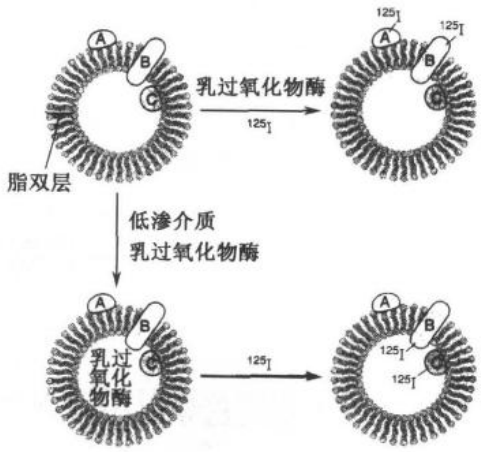


图 3-35 膜泡两侧蛋白质标记的方法（引自 Kleinsmith *et al*.，1995）

上半部是用乳过氧化物酶将^{125}I标记膜泡外侧的蛋白质，其中蛋白 A 和 B 被标出。下半部，将膜泡置于低渗液中，让乳过氧化物酶进入膜泡内侧，然后再加^{125}I标记膜泡内侧的蛋白质，此时被标记的蛋白是 B 和 C。

放射性标记法

前面已介绍过用胰蛋白酶处理完整的细胞或是处理经渗透休克的膜，然后通过电泳分离鉴定膜蛋白在膜中的分布。研究膜蛋白分布的不对称性也可用放射性标记法（radioactive labeling procedure），图 3-35 是由^{125}I标记并研究红细胞膜蛋白分布的基本原理。

实验中首先要分离细胞膜，然后用乳过氧化物酶进行膜蛋白标记。乳过氧化物酶的分子较大，不能透过细胞膜，这样可以用于标记膜外表面的蛋白质，包括外周蛋白和整合蛋白的膜外部分。标记后，分离纯化膜蛋白，经蛋白电泳后放射自显影进行鉴定。若是要标记膜内侧的蛋白质，则需将膜置于低离子强度的溶液中以提高膜的通透性，使乳过氧化物酶进入膜泡后标记膜蛋白的膜内侧部分。

如果要研究膜糖的不对称分布，也可设计类似的实验。可用半乳糖氧化酶（galactose oxidase），催化^{3}H标记糖蛋白上的糖基，然后通过放射性分析即可鉴定糖蛋白及其在膜上的定向。

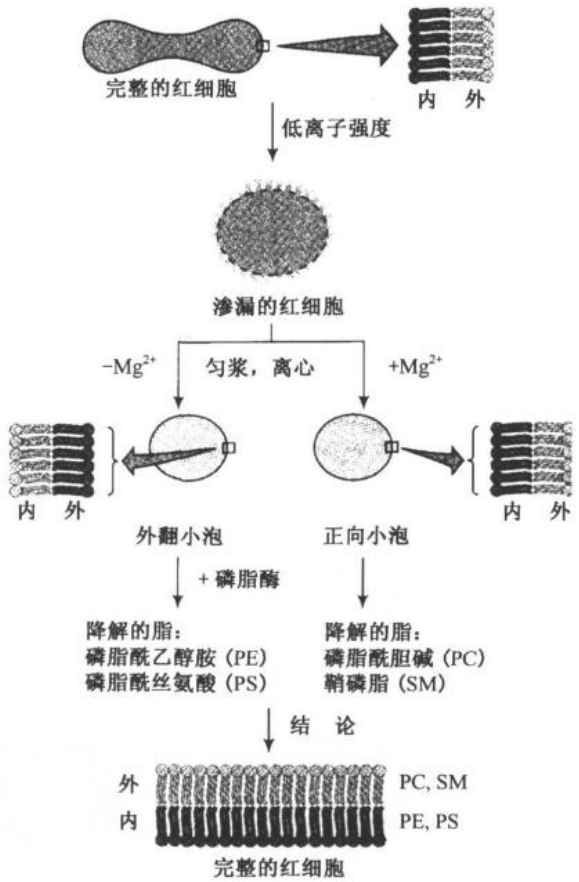


图 3-36 用红细胞正向膜泡和外翻膜泡研究膜脂的分布
（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

脂酶处理法

可以用胰蛋白酶处理法研究膜蛋白的定位，也可以用磷脂酶处理法来研究膜脂在脂双层中的定位（图 3-36）。

由于红细胞具有血影现象，只要将红细胞置于低离子浓度的溶液中，红细胞就会发生渗漏释放出内含物，得到只有红细胞膜的空壳。然后调整溶液中的 Mg^{2+} 浓度，改变红细胞小泡的状态。若是从溶液中除去 Mg^{2+}，则形成外翻的小泡，若是加入 Mg^{2+} 则是正常方向的小泡，然后用脂酶分别处理这两种红细胞膜。常用的脂酶是磷脂酶（phospholipase），由于磷脂酶的分子质量很大而不能通过细胞膜，所以磷脂酶只能附着在膜泡的外表面，能够被磷脂酶水解的是位于外表面的磷脂，然后再根据它原来的状态，确定在红细胞膜脂中的定向。

3.4.3 膜的流动性

根据膜的流动镶嵌模型，说明生物膜是一种动态的结构，具有膜脂的流动性（fluidity）和膜蛋白的运动性（mobility）。膜的流动性概念是指膜内部的脂和蛋白质分子的运动性。膜的流动性不仅是膜的基本特性之一，也是细胞进行生命活动的必要条件。

膜的流动性主要是由膜脂双层的状态变化引起的。在生理条件下，膜脂多呈液晶态，温度下降至某点，则变为晶态。一定温度下，晶态又可熔解再变成液晶态。这种临界温度称为相变温度，在不同温度下发生的膜脂状态的改变称为相变（phase transition）。

膜脂由于成分不同而各有其不同的相变温度。在某一温度下，有些脂处于晶态，另一些脂仍处于液态。处于这两种不同状态的磷脂分子分别各自汇集，形成了相的分离，从而形成一些流动性不一的微区（domain）。由于膜脂的流动，给膜蛋白提供了可以流动的环境，加上膜蛋白自身构型的变化，使膜蛋白处于动态之中。

3.4.3.1 流动性的表现形式

膜的主要成分是脂和蛋白质，所以膜的流动主要是由脂和蛋白质的流动引起的。

膜脂的运动

脂的流动是造成膜流动的主要因素，概括起来，膜脂的运动方式主要有 3 种（图 3-37）：①侧向扩散（lateral diffusion），又称侧向迁移。在同一单脂层内的脂分子经常互相换位，其速

度相当快，有人推测细菌质膜中磷脂以这种方式从细胞的一端扩散到另一端只需1～2s。这种运动始终保持脂分子在质膜中的排布方向：亲水的基团朝向膜表面，疏水的尾指向膜的内部。②旋转（rotation）运动即每个脂分子都围绕其长轴做快速旋转。③翻转扩散（transverse diffusion），又称为翻转（flip-flop），它是指脂分子从脂双层的一个层面翻转至另一个层面的运动。这种运动是很少发生的，也是最为剧烈的一种运动。磷脂发生翻转运动时，磷脂的亲水头部基团必须克服内部疏水区的阻力，这在热力学上是不利的。但是有些细胞含有翻转酶（flippase）能够促使某些磷脂从膜脂的一叶翻转到另一叶，这些酶在维持膜脂的不对称分布中起重要作用。

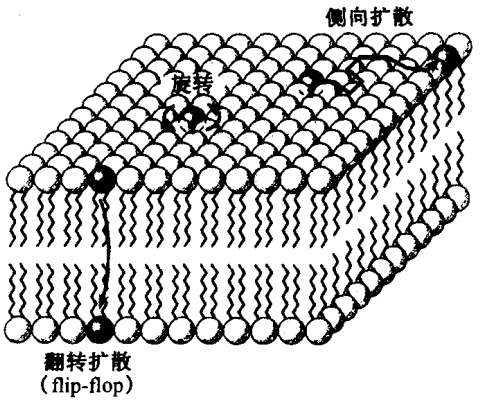


图 3-37　磷脂分子在膜脂双层中的运动方式
（引自 Becker *et al.*，1996）

除了上面几种主要的运动方式外，膜脂还有其他一些运动方式，如弯曲（flexion），即膜脂围绕着与膜平面相垂直的轴进行伸缩摆动。

膜蛋白的运动

由于膜蛋白分子质量较大，它不可能像膜脂那样运动。利用现代分子生物学研究技术和摄像观察，发现依据所研究蛋白的不同，运动方式也不同，可以归纳为以下几种运动形式：①随机移动。有些蛋白质能够在整个膜上随机移动。移动的速率比用人工脂双层测得的要低。②定向移动。有些蛋白比较特别，在膜中做定向移动。例如，有些膜蛋白在膜上可以从细胞的一端移向另一端。③局部扩散。有些蛋白虽然能够在膜上自由扩散，但只能在局部范围内做旋转扩散和侧向扩散。

3.4.3.2　膜流动性的生理意义

细胞质膜适宜的流动性是生物膜正常功能的必要条件。例如细胞质膜中有相当数量的酶催化着不同的反应，酶活性与流动性有极大的关系，如卵磷脂-胆固醇转酰基酶的活性与膜的流动性密切相关，膜流动性大，有利于酶的侧向扩散和旋转运动，酶活性提高。

膜的一个重要功能是参与物质运输，如果没有膜的流动性，细胞外的营养物质则无法进入，细胞内合成的胞外物质（如胞外酶、胞外蛋白）及细胞废物也不能运到细胞外，这样细胞就要停止新陈代谢而死亡。

膜流动性与信号转导有着极大的关系。细胞质膜上有一些蛋白可作为信号分子的受体，它可同细胞外的信号分子结合，然后以某种运动方式，将信号传递到细胞内，如果没有膜的流动性，信号也就无法向细胞内传递。不难想像，细胞与外界失去了信息交流，它还能生存多久。

膜流动性与细胞周期也有密切的关系。研究证明：在M期，膜流动性最大，而在G_1期和S期，膜流动性最低。

细胞的生命活动需要消耗能量，细胞内能量转换的工厂是线粒体和叶绿体（植物）。线粒体和叶绿体都是膜结合的细胞器，能量转换反应包括电子转移和ATP的生成都是在膜中进行

的，如果没有流动性，能量转换是不可能的。

另外，膜的流动性与发育和衰老过程都有相当大的关系。例如成年鼠的脂肪细胞膜与幼年鼠相比，其磷脂的饱和脂肪酸含量较高，膜流动性较低。

3.4.3.3 膜流动性的研究方法

为了研究和证明膜的流动性，科学家们发展了许多不同的研究方法，获得了许多直接的证据，证明了膜的流动性。

人鼠细胞融合实验

细胞融合（cell fusion）即细胞杂交，是将两种不同类型的细胞结合形成一个杂种细胞的过程。融合可通过促溶剂，如灭活的仙台病毒、聚乙二醇等进行诱导。成功融合的细胞只有一个连续的细胞质膜、一个完整的细胞核。

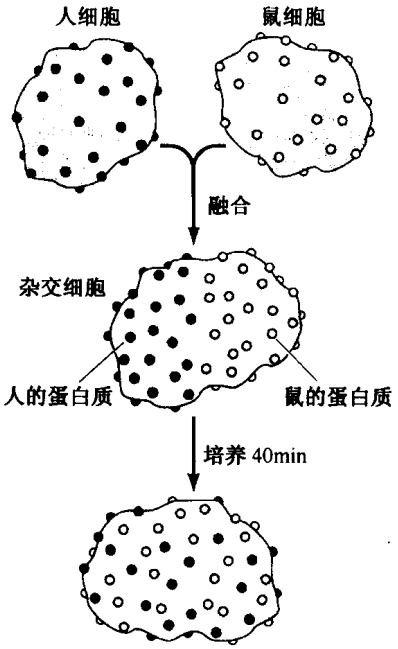


图 3-38 通过细胞融合证明膜蛋白的流动性（引自 Cooper，2000）

将小鼠细胞和人细胞在灭活的仙台病毒诱导下进行融合；将标记的抗体加入到融合的人、鼠细胞中，其中小鼠的抗体是用发绿色荧光的荧光素（fluorescin）进行了标记，人的抗体是用发红色荧光的罗丹明（rhodamine）进行了标记。加入标记抗体分别与融合细胞表面的抗原结合，显示不同的颜色区（空心圆代表绿色，实心的圆代表红色）。将融合细胞置于37℃培养40min，细胞表面的颜色相互混合在一起。将一部分样品置于4℃ 40min，则不出现表面颜色混合（结果未示出）。

1970 年，Frye 和 Edidin 进行了人鼠细胞融合实验，令人信服地证明膜蛋白的流动性（图 3-38）。

淋巴细胞的成斑和成帽反应

通过抗体交联膜蛋白分子聚集成斑（patching）、成帽（capping）反应也是证明膜蛋白在膜平面侧向扩散的例子（图 3-39）。

淋巴细胞是白细胞，通过产生抗体对外源蛋白进行应答，抗体分子位于细胞质膜上。蛋白质能够在不同的动物中诱导产生抗体。如果将小鼠的抗体注入兔子中，兔子将会产生抗小鼠抗体的抗体。可以从兔子的血液中分离这种抗体，并将这种抗体共价连接到荧光染料上，就可以通过荧光显微镜进行观察。

当兔子的抗小鼠抗体的抗体与小鼠的淋巴细胞混合时，带有标记的抗体就会同小鼠淋巴细胞质膜上的抗体结合，并分布在整个淋巴细胞的表面，但很快就会成丛或成斑。导致这种现象的原因是抗体是多价的，每一个兔子的抗体能够同小鼠细胞质膜表面的多个抗体分子反应，也就是说小鼠的每一个膜抗体将同多个兔子的抗体反应。这样，在小鼠淋巴细胞的细胞质膜表面形成“兔抗小鼠抗体-小鼠膜结合抗体”的斑。斑会逐渐聚集扩大，当小鼠淋巴细胞质膜表面抗体全部同兔子的抗小鼠抗体结合后，将会在细胞表面的一侧形成“帽子”结构，最后通过内吞作用进入细胞。很显然，如果小鼠细胞质膜中的抗体蛋白不能自由的进行侧向扩散的话，斑和帽都是不能够形成的。

用外源凝集素也可以诱导类似的反应，但在原理上是完全不同的。

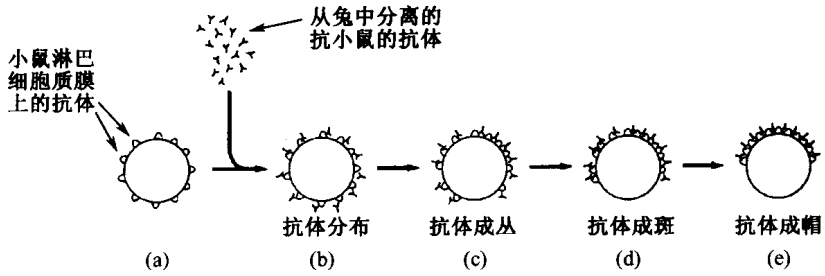


图 3-39　膜蛋白流动的证明：成斑和成帽效应（引自 Becker *et al*., 1996）

荧光漂白恢复

荧光漂白恢复（fluorescence recovery after photobleaching, FRAP）不仅能够证明膜的流动性，同时也能测量膜蛋白扩散的速率。实验中首先用荧光物质标记膜蛋白或膜脂，然后用激光束照射细胞表面某一区域，使被照射区域的荧光淬灭变暗形成一个漂白斑。由于膜的流动性，漂白斑周围的荧光物质随着膜蛋白或膜脂的流动逐渐将漂白斑覆盖，使淬灭区域的亮度逐渐增加，最后恢复到与周围的荧光光强度相等（图 3-40）。

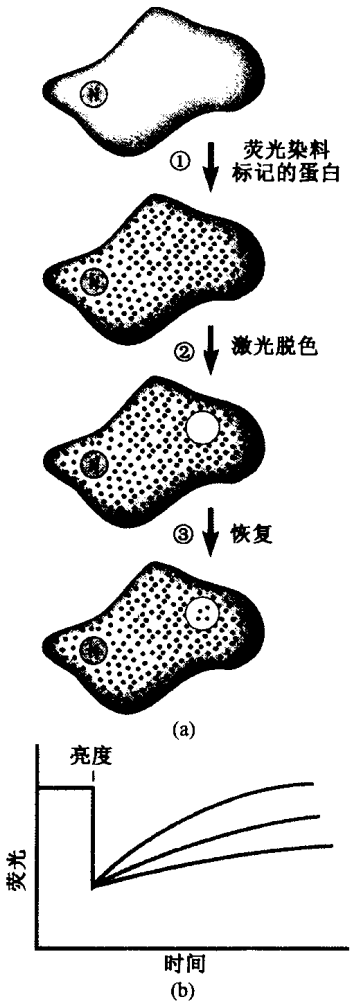


图 3-40　荧光漂白恢复测定膜蛋白的扩散速率（引自 Karp, 1999）

(a) 荧光漂白恢复。实验的第一步是用荧光染料标记膜蛋白；第二步是用激光束在细胞表面产生圆形漂白斑；第三步是随着时间的推移，漂白区逐渐恢复荧光。图中 N 代表细胞数量。(b) 经照射形成的白斑恢复荧光的速率，与蛋白质流动的速率系数正相关。

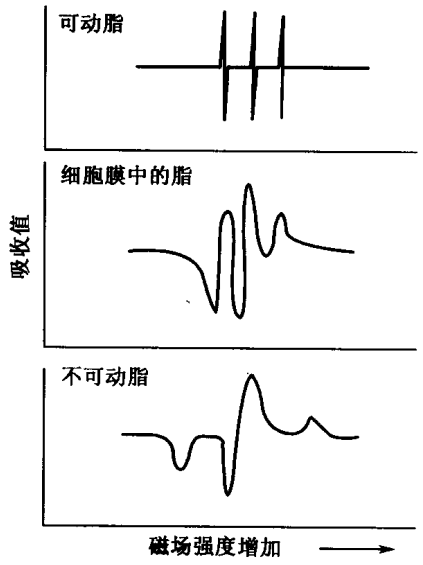


图 3-41　电子自旋共振谱证明膜脂的流动（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

上：含有自旋标记的磷脂的溶液在室温时产生典型的完全移动的 ESR 光谱；下：当将含有自旋标记的溶液的温度降低至 -65℃，此时的 ESR 光谱是不动的自旋标记的磷脂发出的；中：将自旋标记的磷脂插入到细胞膜中，在室温下测其 ESR 光谱，此时的光谱是膜流动状态下的自旋标记的磷脂发出的。

细胞膜蛋白的标记方法有很多种。可以用非特异性的染料，如用异硫氰酸荧光素（fluorescein isothiocyanate，FITC）将细胞膜蛋白全部进行标记。也可用特异性的探针（如荧光抗体）标记特异的膜蛋白。膜蛋白一旦被标记就可用激光束进行局部照射处理，使荧光脱色，从而形成直径约为 1μm 的白斑，若是可移动的膜蛋白，则会因蛋白的移动，使白斑消失，若是不能移动的蛋白，则白斑不会消失。

根据荧光恢复的速度，可推算膜脂的扩散速度为每秒钟几个微米，而膜蛋白的扩散速度变化幅度较大，少数膜蛋白的扩散速度可达到膜脂的扩散速度，大多数蛋白的扩散速度都比膜脂慢，还有一些膜蛋白完全限于某一个区域。正是这种限制，使膜形成一些特定的膜微区（membrane domain），这些微区具有不同的蛋白组成和功能。这实际上是膜蛋白不对称分布带来膜功能的不对称。

FRAP 技术也有它的不足之处。第一，它只能检测膜蛋白的群体移动，而不能观察单个蛋白的移动。其次，它不能证明膜蛋白在移动时是否受局部条件的限制。为了克服这些不足，发展了单颗粒示踪（single-particle tracking，SPT）技术，可以用抗体金（直径为 15～40nm）来标记单个膜蛋白，然后通过计算机控制的摄像显微镜进行观察。

电子自旋共振谱技术

最早证明脂双层中脂的流动性实验是 20 世纪 60 年代 McConnell 和 Griffith 用电子自旋共振谱（electron spin-resonance spectrocopy，ESR）技术获得的。在该技术中将一个含有不配对的电子基团（通常是硝基氧基团）加到磷脂的脂肪酸尾端，这就是所谓的自旋标记（spin-label）。当将标记脂暴露于外加磁场时，由于不配对电子基团的存在，它能够自旋产生顺磁场信号，这种共振能够被仪器检测获得共振谱。如果被标记的脂位于脂双层，根据共振谱就可以判断膜脂的流动性。

McConnell 和 Griffith 先标记非膜结构的脂肪，然后让这种脂分别处于室温和 －65℃ 去检测共振谱，同时将标记的脂插入到细胞膜中再检测共振谱（图 3-41）。

3.4.3.4 影响膜流动性的因素

影响膜流动性的因素主要来自膜本身的组成成分、遗传因子及环境的理化因素（如温度、pH、离子强度、药物等）。

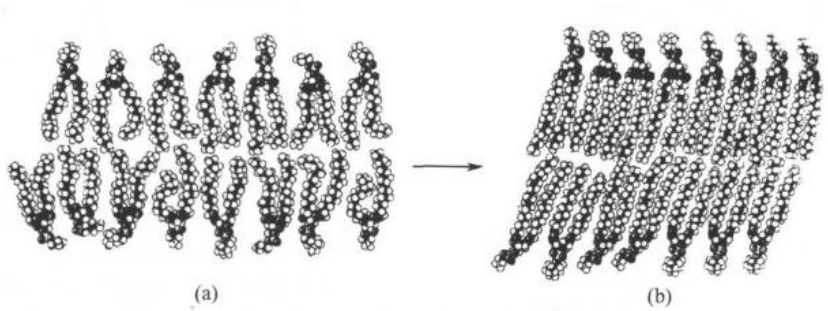


图 3-42 温度影响脂双层的结构状态（引自 Karp，1996）

图中所示是由磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺构建的人工脂双层。(a) 在相变温度以上，磷脂有较大的自由度；(b) 在相变温度以下，磷脂的运动大大受限制，成为结晶的胶态。

温度对膜流动性的影响

温度（temperature）是影响膜流动性最主要的因素。膜的骨架成分是脂，如同其他的物质一样，既可以是晶态，又可以液态存在，主要是根据温度的变化而定。例如用磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺构建的人工脂双层结构，37℃时，是以相对流动的液态存在，呈现典型的二维液晶。如果温度慢慢地降低达到某一点时，脂就会由正常的拟液态（liquidlike state）变成冷冻的晶体胶态（frozen crystalline gel），磷脂的运动大受限制（图 3-42），这种温度就是相变温度（transition temperature）。

膜脂的结构和组成对膜流动性的影响

膜脂的结构与组成的不同，会大大改变膜的相变温度。脂的结构和组成对膜流动性的影响主要表现在 4 个方面：脂肪酸链的长度、脂肪酸链的饱和程度、脂双层中胆固醇的含量以及卵磷脂和鞘磷脂的比值。

（1）*脂肪酸链的长度对流动性的影响*　长链的脂肪酸具有较高的相变温度，而短链脂肪酸的相变温度较低，这就意味着，膜若是含有丰富的长链脂肪酸，那么流动性就低。反之，膜中短链脂肪酸的含量丰富，膜的流动性就高，其原因是短链能减低脂肪酸链尾部彼此相互作用，在相变温度以下，不易相互凝集。

（2）*脂肪酸链的不饱和程度对流动性的影响*　不饱和脂肪酸比饱和脂肪酸具有较低的相变温度，也就是说，如果膜脂中含有丰富的不饱和的脂肪酸，膜的流动性就高。原因可能是不饱和双键的存在会降低膜脂分子间排列的有序性，增加了膜的流动性。

（3）*胆固醇对膜流动性的调节作用*　真核细胞膜中有大量的胆固醇插在磷脂之间，几乎多至每一个磷脂分子就有一个胆固醇。胆固醇的甾环区与磷脂分子的脂肪酰链相互作用，可以加强膜脂双层的稳定性，增加膜脂有序性而降低其流动性，调节膜的机械性能。

在相变温度以上，胆固醇可使磷脂分子的脂酰链末端的甲基运动减小，即限制膜的流动性。在相变温度以下，胆固醇可增加脂类分子脂酰链的运动，这样可以增强膜的流动性。也就是说在相变温度以下，增加胆固醇可提高流动性；在相变温度以上，增加胆固醇则降低膜的流动性，所以认为胆固醇是膜结构中“可塑分子”（plasticizer）。

胆固醇的可塑性对于动物细胞质膜具有重要意义，所以一些动物细胞质膜中磷脂与胆固醇的比值达到 1∶1；但在核膜中只有1∶(0.1～0.2)，在线粒体膜中只有1∶(0.02～0.05)，因为在这些细胞器中，胆固醇存在的意义不大。

胆固醇除了调节膜的流动性外，在磷脂双层中还有其他的作用。它能够迫使磷脂的头部分开，促进膜表面的分子穿过内层。通过这种影响，胆固醇帮助结合在膜表面的蛋白质分子进入细胞。虽然胆固醇能够促进蛋白质进入细胞，但也能促使脂双层磷脂的尾部合拢，以阻止离子和一些物质（如葡萄糖等）的进入。

（4）*卵磷脂和鞘磷脂比值对膜流动性的影响*　哺乳动物膜中卵磷脂和鞘磷脂的含量约占整个膜脂的 50%，其中卵磷脂所含的脂肪酸链的不饱和程度高，链较短，相变温度低。因此，若卵磷脂含量高，则流动性大。而鞘磷脂则与之相反，它含的脂肪酸链的饱和程度高，相变温度也高，因此，若鞘磷脂的含量高，则流动性低。

在 37℃时，两种脂均处于流动状态，但后者的微黏性较大。衰老的细胞膜和动脉硬化的细胞膜上的卵磷脂和鞘磷脂的比值低，流动性低。

膜蛋白对膜流动性的影响

虽然膜蛋白能够在膜中进行侧向扩散和旋转运动，但由于膜蛋白与膜脂的结合是功能性的，它必然要以某种方式同细胞内、细胞外、细胞与细胞间发生联系，组成特殊的膜区，这样，膜蛋白的运动就会受到限制，从而影响了膜的流动性。如整合蛋白往往聚集成群，因而影响相互的运动；膜整合蛋白往往同膜下骨架相连或同细胞外基质成分相互作用，这样必然影响膜蛋白的流动性；有些整合蛋白具有细胞连接的作用，特别是参与紧密连接的蛋白质基本是固定不动的；还有些整合蛋白与细胞外配体、抗体及药物大分子等相互作用，这些都是限制膜蛋白运动的因素。膜蛋白某些限制膜流动性的因素综合示于图 3-43。

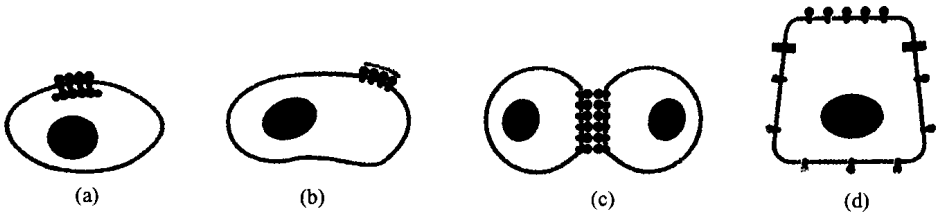


图 3-43　四种限制膜蛋白侧向扩散的方式（引自 Alberts *et al*., 1998）
（a）细胞质膜下的骨架结构与膜整合蛋白结合限制膜蛋白移动；（b）细胞外基质中的某些分子与膜整合蛋白结合限制了膜蛋白的移动；（c）膜蛋白与另一细胞的膜蛋白作用限制了自身的移动；（d）膜中其他不动蛋白限制了膜蛋白的移动。

另外，膜蛋白和膜脂相互作用也会对膜脂流动性产生影响，如整合蛋白使膜脂的微黏性增加，从而使膜流动性降低。

3.5　物质的跨膜运输

细胞质膜对细胞的生命活动起保护作用，为细胞的生命活动提供相对稳定的环境，这是细胞质膜最基本的功能。细胞质膜最基本的性质是具有半通透性，不允许细胞内外的分子和离子自由出入。但是由于细胞的生命活动是特殊的分子运动，细胞内有些物质或离子的浓度特别高，这就要求细胞质膜不仅仅作为物质出入细胞的障碍，还要具有控制分子和离子通过的能力。换句话说，细胞质膜必须具有选择性地进行物质跨膜运输、调节细胞内外物质和离子的平衡及渗透压平衡的能力。

3.5.1　质膜物质运输概述

各种细胞及细胞内的膜结合细胞器最基本的特点是能够维持不同的物质浓度，完成不同的生命活动。这些物质中有些是生物大分子，有些则是离子。细胞维持物质的不同浓度有双重作用。一方面，它要保持细胞代谢物的稳定，不让它们随意渗漏到周围环境中，另一方面，又要能够进行必要的物质交换，包括代谢物的排除和分泌及营养物质的吸收。

3.5.1.1 物质运输的范畴

细胞进行的物质运输，具有3种不同的范畴。

细胞运输（cellular transport）　这种运输主要是细胞与环境间的物质交换，包括细胞对营养物质的吸收、原材料的摄取和代谢废物的排除及产物的分泌。如细胞从血液中吸收葡萄糖以及细胞质膜上的离子泵将 Na^+ 泵出、将 K^+ 泵入都属于这种运输范畴。

胞内运输（intracellular transport）　这是真核生物细胞内膜结合细胞器与细胞内环境进行的物质交换。包括细胞核、线粒体、叶绿体、溶酶体、过氧化物酶体、高尔基体和内质网等与细胞内的物质交换。

转细胞运输（transcellular transport）　这种运输不仅仅是物质进出细胞，而是从细胞的一侧进入，从另一侧出去，实际上是穿越细胞的运输。在多细胞生物中，整个细胞层作为半透性的障碍，而不仅仅是细胞质膜。如植物的根部细胞负责吸收水分和矿物质，然后将它们运输到其他组织即是这种运输。

3.5.1.2 膜运输机制：被动运输与主动运输

膜是溶质自由出入细胞的重要障碍，这种障碍作用对于细胞的功能而言既是必须的，但有时又是不利的，必须克服。

根据运输时对化学能的需求，将溶质的跨膜运输分为两大类：被动运输（passive transport）和主动运输（active transport），图3-44显示了这两种运输的主要特点。

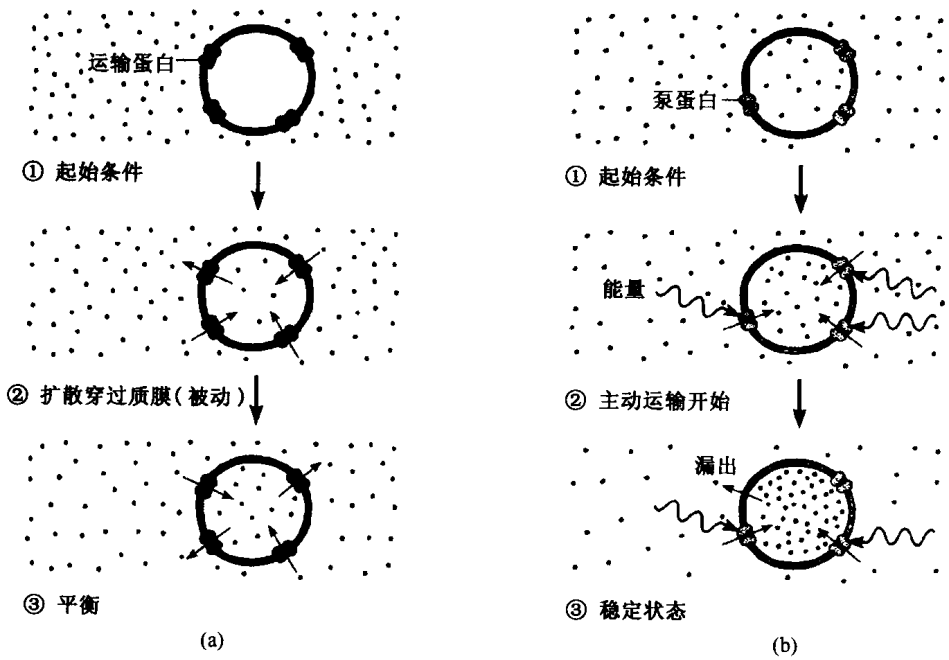


图3-44　被动运输和主动运输（引自 Becker *et al*., 2000）

(a) 被动运输倾向于细胞内外物质浓度的平衡，这种运输不消耗化学能。(b) 主动运输是打破细胞内外物质浓度的平衡，使用化学能去建立浓度梯度。

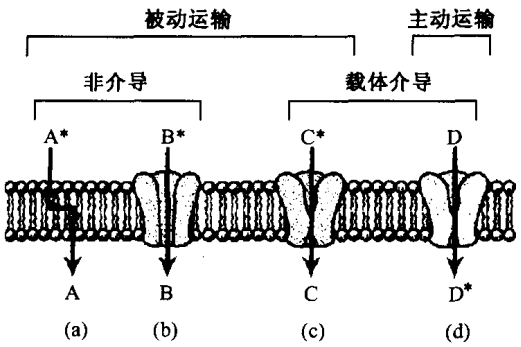


图 3-45 物质跨膜运输的 4 种基本机制
(引自 Karp, 1999)
图中用标有 * 号的字母表示溶液的高浓度。(a)通过脂双层的简单扩散;(b)通过膜整合蛋白形成的水性通道进行的被动运输;(c)通过同膜蛋白的结合进行的帮助扩散,也同(a)和(b)一样,只能从高浓度区向低浓度区运输;(d)通过载体介导的主动运输,这种载体主要是酶,能够催化物质从低浓度区向高浓度区运输。

被动运输倾向于将溶解的分子依靠扩散从高浓度区流向低浓度区,不消耗 ATP。主动运输需要消耗 ATP,因为通过这种方式运输的通常是极性分子和大分子,或是将物质从低浓度区向高浓度区运输,最后建立新的浓度梯度。

在被动运输中,虽然有些分子由于分子小或非极性可以自由扩散通过脂双层,但是大多数被动运输都需要膜蛋白的帮助。帮助被动运输的膜蛋白主要是跨膜蛋白,根据它们作用方式的不同可分为两种类型:通道蛋白和载体蛋白。通道蛋白帮助被动运输时不需同被运输的物质结合,只是提供一个亲水的通道;而载体蛋白需要同被运输的分子结合,然后帮助被运输的分子通过膜。这两种膜蛋白在促进扩散时都不需要消耗 ATP,也不能将物质从低浓度区运向高浓度区。

与被动运输不同的是,主动运输都是由特殊的膜蛋白帮助的,这些膜蛋白被称之为泵(pump),实际上是一些酶蛋白,它们能够水解 ATP,然后利用 ATP 水解的能量驱使物质进行逆浓度梯度的运输。图 3-45 所示是溶质分子跨膜运输的 4 种机制,并从总体上对被动运输和主动运输进行比较。

3.5.1.3 膜运输蛋白

无论是被动运输还是主动运输,都有膜蛋白的参与,这些蛋白被称为膜运输蛋白(membrane transport protein)。膜运输蛋白是膜整合蛋白,或是大的跨膜分子复合物。

膜运输蛋白的鉴定

细胞质膜上有很多蛋白质,如何鉴定膜运输蛋白?目前有两种鉴定方法(图 3-46),一种

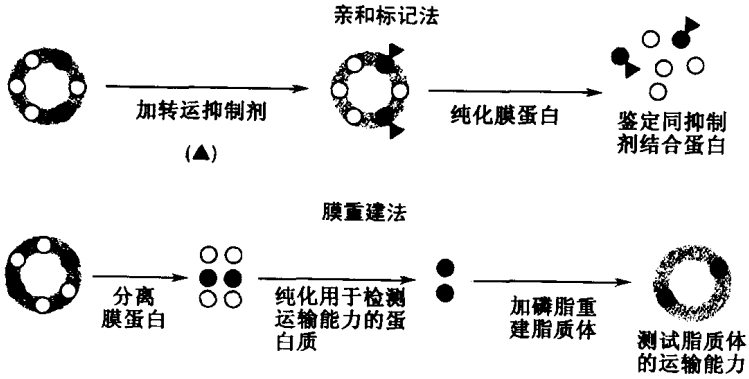


图 3-46 鉴定膜运输蛋白的两种方法(引自 Kleinsmith *et al.*, 1995)
上:亲和标记法,在此法中常常用到特异运输系统的抑制剂。下:膜重建法。

是亲和标记（affinity labeling），另一种是膜重建（membrane reconstitution）。

在亲和标记法中，主要是用放射性标记的分子抑制某种物质的运输。这种抑制作用是由抑制剂同膜运输蛋白的结合引起的，然后分离膜蛋白，鉴定同抑制剂结合的膜蛋白。例如细胞松弛素 B 是葡萄糖运输蛋白的抑制剂，因此将放射性标记的细胞松弛素 B 加入到细胞液中，就可同膜中葡萄糖运输蛋白结合，然后从膜中分离蛋白，通过放射性分析鉴定膜运输蛋白。在膜重建法中，首先要分离纯化膜蛋白质，然后将分离纯化的蛋白质同磷脂混合，构建人工脂质体，然后检测脂质体的运输能力。

离子载体在膜运输蛋白功能研究中的应用

人们对自然状态下的膜运输特性的认识主要来自离子载体（ionophore）的应用。所谓离子载体是一些能够极大提高膜对某些离子通透性的物质。大多数离子载体是细菌产生的抗生素，它们能够杀死某些微生物，其作用机制就是提高了靶细胞膜通透性，使得靶细胞无法维持细胞内离子的正常浓度梯度而死亡，所以离子载体并非是自然状态下存在于膜中的运输蛋白，而是人工用来研究膜运输蛋白的一个概念。根据改变离子通透性的机制不同，将离子载体分为两种类型：通道形成离子载体（channel-forming ionophore）和离子运载离子载体（ion-carrying ionophore）。

短杆菌肽 A（gramicidin A）是一种通道形成离子载体，是一种由 15 个氨基酸组成的线性肽，其中 8 个是 L-氨基酸，7 个是 D-氨基酸，它具有疏水的侧链，两个分子在一起形成跨膜的通道。它能够有选择地将单价阳离子顺电化学梯度通过膜（图 3-47），不过它并不显著提高运输速度。可被短杆菌肽 A 离子通道运输的阳离子有：$H^+ > NH_4^+ > K^+ > Na^+ > Li^+$。

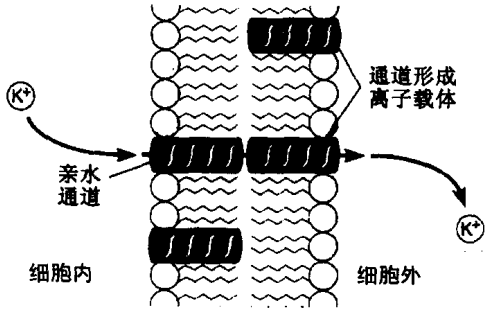


图 3-47　短杆菌肽 A 离子载体作用机制
（引自 Becker *et al*., 1996）

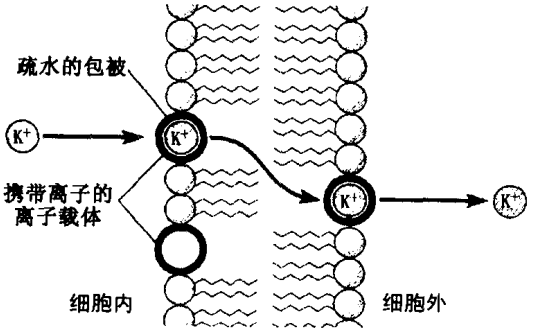


图 3-48　离子运载的离子载体的作用机制
（引自 Becker *et al*., 1996）

缬氨霉素（valinomycin）是一种由 12 个氨基酸组成的环形小肽，它是一种脂溶性的抗生素。将缬氨霉素插入脂质体后，通过环的疏水面与脂双层相连，极性的内部能精确地固定 K^+。它在一侧结合 K^+，然后向内侧移动通过脂双层，在另一侧将 K^+ 释放到细胞内（图 3-48）。缬氨霉素可使 K^+ 的扩散速率提高100 000倍，但是它不能有效地提高 Na^+ 的扩散速度。这一实验说明两个问题，一是载体蛋白能够极大提高运输速度，二是载体具有特异性。

从上面介绍的两个离子载体的例子可以得到两个基本结论：① 膜运输蛋白具有选择性；② 膜运输蛋白通过两种机制进行物质运输，一是形成水性通道，二是同被运输的物质结合，以可动的形式穿膜，即可动载体（mobile carrier）的运输。

3.5.2 被动运输

非电解质通过扩散跨过细胞质膜进入细胞必须具备两个条件：第一，该物质在细胞外的浓度很 高；第二，细胞质膜必须对这种物质具有通透性。膜对某种溶质具有透性，必须满足两个条件之一：溶质自身能够直接穿过脂双层，或是质膜中有可允许该溶质通过的跨膜孔道。

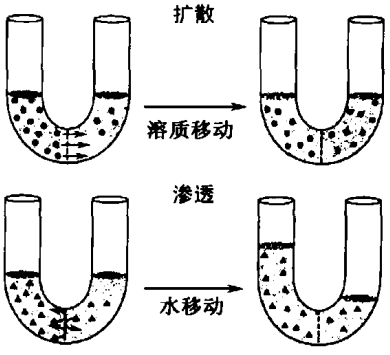


图 3-49 简单扩散和渗透的比较
上：在简单扩散中，膜允许溶质透过；溶质从浓度高的一侧移向浓度低的一侧，当达到平衡时，两侧的浓度相等。下：在渗透中，膜不允许溶质透过，但是，水能够从溶质浓度低的一侧向溶质浓度高的一侧扩散。当达到平衡时，两侧溶质的浓度是相等的，但含有过多水分的一侧具有较高水压。

3.5.2.1 扩散与渗透

细胞质膜具有两个基本的特性：允许小分子物质通过扩散（diffusion）穿过细胞质膜，也可以让水通过渗透（osmosis）通过细胞质膜。但是扩散和渗透在概念上是不同的（图 3-49）。

扩散是指物质沿着浓度梯度从半透性膜浓度高的一侧向低浓度一侧移动的过程，通常把这种过程称为简单扩散。这种移动方式是单个分子的随机运动，无论开始的浓度有多高，扩散的结果是两边的浓度达到平衡。虽然这种移动不需要消耗化学能，主要是依靠扩散物质自身的力量，但从热力学考虑，它利用的是自由能。如果改变膜两侧的条件，如加热或加压，就有可能改变物质的流动方向，其原因就是改变了自由

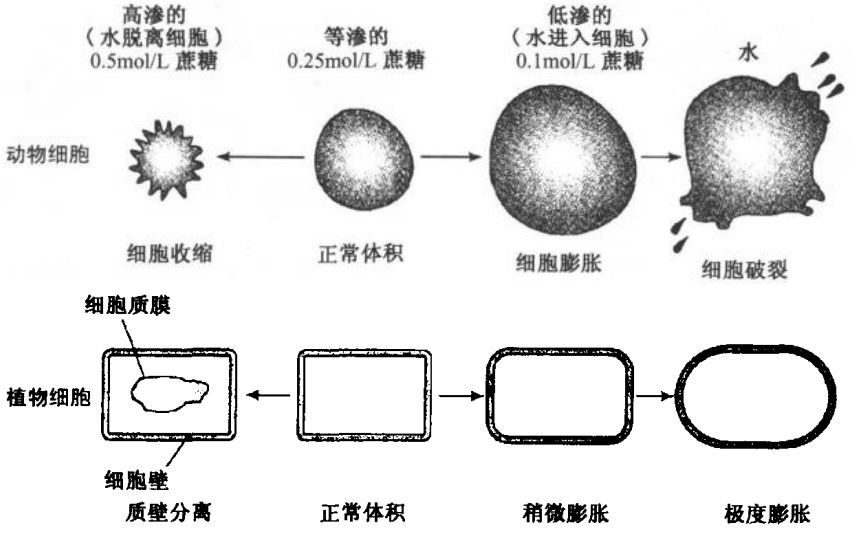


图3-50 动物细胞和植物细胞在不同浓度的蔗糖溶液中的行为(引自 Kleinsmith *et al.*, 1995)
上：当将动物细胞置于高渗溶液中，水则会从细胞中渗出，细胞发生收缩。细胞在低渗溶液中，细胞会吸水膨胀和破裂。下：当将植物细胞置于高渗溶液中，细胞脱水发生质壁分离（plasmolysis）。若是低渗溶液，植物的细胞壁保护细胞防止膨胀破裂，此时由于水的进入，细胞内的压力升高，使细胞变得坚硬。

能。所以，严格地说，扩散是物质从自由能高的一侧向自由能低的一侧流动。

渗透的含义则是指水分子以及溶剂通过半透性膜的扩散。水的扩散同样是从自由能高的部位向自由能低的部位移动，如果考虑到溶质的话，水是从溶质浓度低的地方向溶质浓度高的地方流动。

细胞的渗透现象能够很好地解释生物学上的一个熟知的现象：细胞在不同浓度的溶液中，会发生膨胀（swell）或收缩（shrink）。实际上这种现象取决于溶液中的溶质和细胞中该物质的浓度（图 3-50）。

正是根据水与水中溶质在膜通透性上的差别，才将膜称为半透性的（semipermeable）。当两种不同浓度的溶液被半透性的膜分隔开后，高溶质浓度的一侧是高渗的（hypertonic），而低溶质一侧则是低渗的（hypoosmotic）。若两侧的溶质浓度相等，则称为等渗的（iso-osmotic）。

3.5.2.2 被动运输：简单扩散及限制因素

简单扩散（simple diffusion）是被动运输的基本方式，不需要膜蛋白的帮助，也不消耗 ATP，而只靠膜两侧保持一定的浓度差，通过扩散发生的物质运输。

细胞质膜的这种被动运输方式并非对任何物质都是适合的，它具有一定的限制，限制因素是物质的脂溶性、分子大小和带电性。

19 世纪末，Overton 根据植物细胞的质壁分离现象做了一系列的实验，研究不同的物质对细胞质膜的通透性。例如将植物细胞放在高浓度的蔗糖溶液中，很快就可以在显微镜下观察到质壁分离，但是将蔗糖溶液换成浓的酒精（乙醇）溶液，则看不到质壁分离，据此推测，乙醇能够快速扩散进入细胞内，直到细胞内外的平衡。后来用含有不同物质的浓溶液重复这一实验，并测量它们的扩散速率，最后得出结论：细胞质膜的通透性具有选择性。他发现物质的脂溶性（在油/水中的分配系数）越强，越容易通过质膜（图 3-51）。

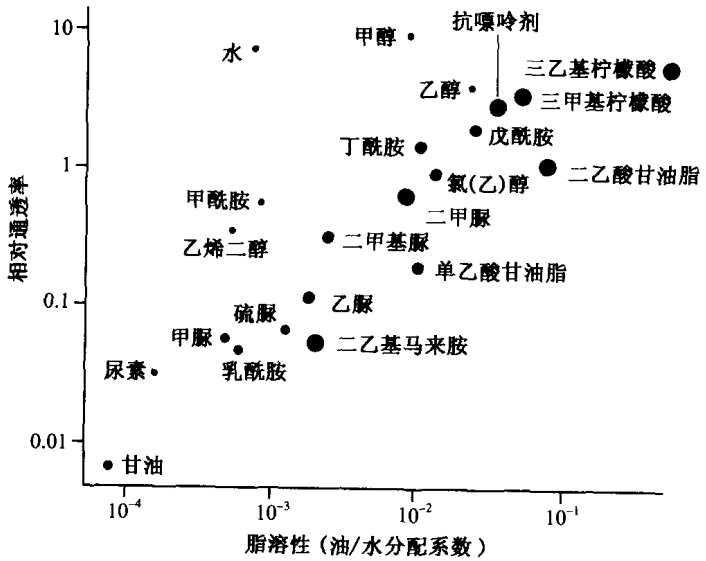


图 3-51 溶质的脂溶性与通过细胞膜能力的关系（引自 Kleinsmith *et al.*, 1995）

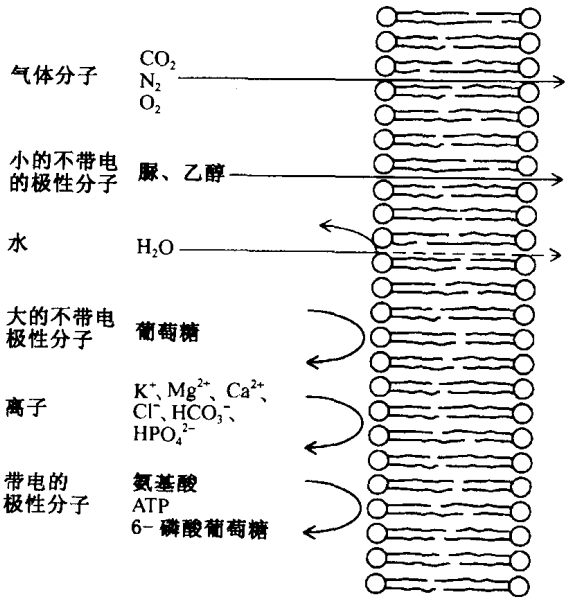


图 3-52 不同分子对人工磷脂双层膜的通透性（引自 Lodish et al., 1995）

小的疏水分子和小的不带电的极性分子能够透过人工膜；水具有一定的透性，离子和大的不带电的极性分子不能通过膜。

20 世纪 30 年代，Collander 的实验室进行了另外一些实验研究细胞质膜的通透性，发现分子本身的大小也是十分重要的，有些分子的脂溶性高，但是分子大，扩散的速率就很慢，只有那些分子质量小，脂溶性高的分子才能快速扩散。根据实验结果，还推测质膜的通透性孔径不会大于 0.5～1.0nm，能够扩散的最大的生活物质是水分子。

物质的带电性也是限制扩散的一个主要因素。带电的物质通常同水结合形成一个水合的外壳，这不仅增加了它们的分子体积，同时也大大降低了脂溶性。因此，所有带电荷的分子（离子），不管它多小，都是不能自由扩散的。

一般说来，气体分子（如 O_2、CO_2、N_2）、小的不带电的极性分子（如脲、乙醇）、脂溶性的分子等易通过质膜，大的不带电的极性分子（如葡萄糖）和各种带电的极性分子都难以通过质膜（图 3-52）。

3.5.2.3 被动运输：促进扩散及特点

由于膜具有选择性通透作用，使一些脂溶性和小分子较为容易进入细胞，但是限制了一些大的和带电荷的物质进入细胞，而这些物质通常是细胞生命活动所必需的。一般说，大分子、非脂溶性的物质和带电荷的物质只要有足够的时间都可通过扩散进入细胞，但由于它们的扩散系数低，通过扩散进入细胞的速度太慢，这就影响了细胞的正常生命活动，为此细胞需要一种方式加速这些物质从高浓度向低浓度的运输，质膜上有一些被称为运输蛋白的膜蛋白担当了此任，这种运输被称为促进扩散（facilitated diffusion）。

促进扩散又称易化扩散、协助扩散，或帮助扩散。是指非脂溶性物质或亲水性物质，如氨基酸、糖和金属离子等借助细胞膜上的膜蛋白的帮助顺浓度梯度或顺电化学浓度梯度，不消耗 ATP 进入膜内的一种运输方式。促进扩散同简单扩散相比，具有以下一些特点：①促进扩散需要膜蛋白的帮助，并且扩散速度比简单扩散的速度要快几个数量级。②简单扩散的速率与溶质的浓度成正比，而膜蛋白帮助的促进扩散可以达到最大值，

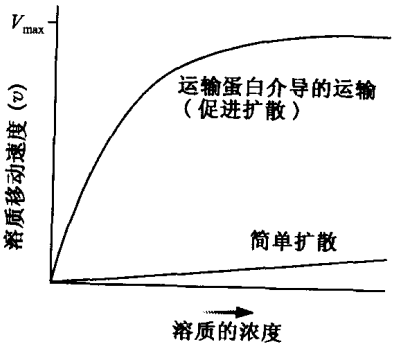


图 3-53 促进扩散与简单扩散的动力学比较（引自 Karp, 1996）

当溶质的跨膜浓度差达到一定程度时，促进扩散的速度不再提高（图 3-53）。③在简单扩散中，结构上相似的分子以基本相同的速度通过膜，而在促进扩散中，运输蛋白对结构相似的分子要进行严格地鉴别，换句话说，运输蛋白具有高度的选择性。如运输蛋白能够帮助葡萄糖快速运输，但不帮助与葡萄糖结构类似的糖类运输。运输蛋白对溶质的特异性相当于酶与底物的特异性，这也说明运输蛋白具有与溶质结合的位点，这种位点与酶分子的活性位点作用相似。④与简单扩散不同，运输蛋白的促进扩散作用会受到各种抑制。膜运输蛋白的运输作用也会受到类似于酶的竞争性抑制，以及蛋白质变性剂的抑制作用，因此，运输蛋白又被称为透性酶（permease）。

3.5.2.4 通道蛋白与促进扩散

从离子载体的研究可知，通道蛋白（channel protein）是一类横跨质膜，能使适宜大小的分子及带电荷的分子通过简单的自由扩散运动，从质膜的一侧转运到另一侧。通道蛋白可以是单体蛋白，也可以是多亚基组成的蛋白，它们都是通过疏水的氨基酸链进行重排，形成水性通道（图 3-54）。通道蛋白本身并不直接与小的带电荷的分子相互作用，这些小的带电荷的分子可以自由地扩散，通过由脂双层中膜蛋白带电荷的亲水区所形成的水性通道。通道蛋白的运输作用具有选择性，所以在细胞质膜中有各种不同的通道蛋白。通道蛋白参与的只是被动运输，在运输过程中并不与被运输的分子结合，也不会移动，并且是从高浓度区向低浓度区运输，所以运输时不消耗 ATP。通道蛋白运输速度很快，每秒钟可有10 000 000个离子通过。

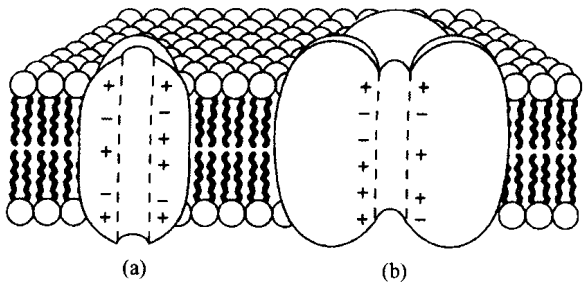


图 3-54 极性（带电性）通道的形成
(a)由单亚基膜蛋白形成的通道；(b)由多亚基蛋白形成的通道。

目前发现的通道蛋白已有 50 多种，主要是离子通道（ion channel）蛋白。

现已鉴定过的离子通道蛋白在膜中都有开和关两种构型，相当于门，所以将通道蛋白形成的通道称为闸门通道（gated channel）。门的开启和关闭受复杂的生理环境的调控，并被各种不同的因子所诱导。根据闸门通道开启和关闭的条件，将已鉴定的通道蛋白分为两种主要的类型：电位闸门通道和配体闸门通道，另外还有一种不常见的闸门通道就是动力敏感闸门通道（mechanosensitive-gated channel）或称动力闸门通道（mechanically gated channel）。有些配体闸门通道的门朝向细胞外基质面，因为与之结合的配体存在于细胞外基质中；而有些配体闸门通道的门朝向胞质溶胶面，因为与之结合的配体存在于细胞内（图 3-55）。

电位闸门通道（voltage-gated channel） 这类通道的构型变化依据细胞内外带电离子的状态，主要是通过膜电位的变化使其构型发生改变，从而将“门”打开。在很多情况下，电位闸门通道有其自己的关闭机制，它能快速地自发关闭；开放往往只有几毫秒时间。在这短暂瞬息时间里，一些离子、代谢物或其他溶质顺着浓度梯度自由扩散通过细胞膜。电位闸门通道主要存在于神经细胞，在神经细胞的信号转导中起重要作用；也存在于其他的一些细胞，

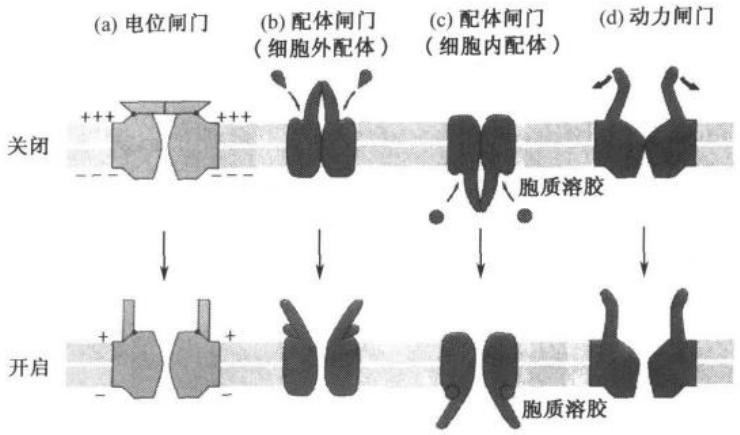


图 3-55　几种不同的闸门离子通道（引自 Alberts *et al.*，1998）

包括肌细胞、卵细胞、原生动物和植物细胞。大家熟知的例子就是含羞草的叶片在触摸时发生的叶卷曲就是通过电位闸门通道传递信号的。

配体闸门通道　这类通道在其细胞内外的特定配体（ligand）与膜受体结合时发生反应，引起门通道蛋白的一种成分发生构型变化，结果使“门”打开。因此这类通道被称为配体闸门通道（ligand-gated channel），它分为细胞内配体和细胞外配体两种类型。

牵张闸门通道　这种通道的打开受一种力的作用，听觉毛细胞的离子通道就是一个极好的例子。声音的振动推开牵张闸门通道（stretch-gated channel），允许离子进入听觉毛细胞，这样建立起一种电信号，并且从毛细胞传递到听觉神经，然后传递到脑（图 3-56）。

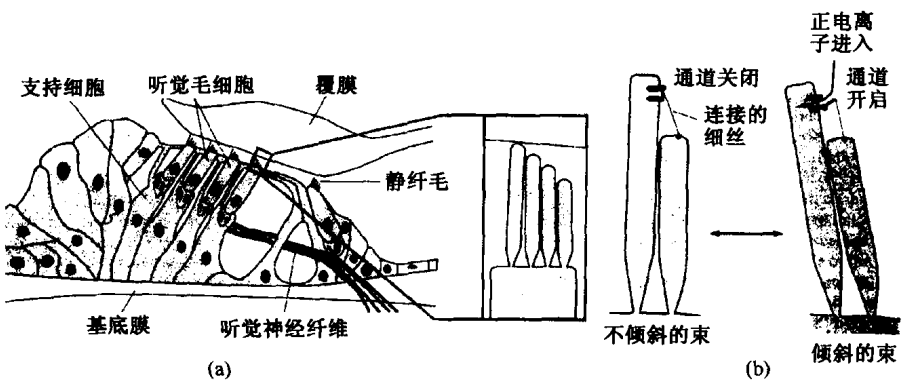


图 3-56　牵张激活的离子通道作用原理

(a) 听觉系统的组织结构。(b) 听觉信号的传递：声音的震动引起基底膜的震动，从而使静纤毛倾斜。由于静纤毛倾斜，拉动了细丝，因而拉开了静纤毛膜上的牵张闸门通道，使周围溶液中带正电荷的离子进入细胞，从而将听觉信号传递给位于下面的听觉神经细胞。

电位闸门通道和配体闸门通道蛋白广泛存在于各种组织细胞质膜中，有些离子往往有几种不同类型的闸门通道。Ca^{2+} 闸门通道广泛存在于真核生物中，在某些神经细胞中存在电位 Ca^{2+} 闸门通道，传递电脉冲信号。在肌细胞中，电位 Ca^{2+} 闸门通道可以通过调节细胞 Ca^{2+}

浓度触发肌肉收缩。细胞中也存在配体 Ca^{2+} 闸门通道和机械 Ca^{2+} 闸门通道。同样，K^+ 和 Na^+ 也都有电位和配体闸门通道。离子通道的研究在临床上具有重要意义，一些遗传缺陷与离子通道有关。目前已经克隆了部分通道蛋白的基因，测定其蛋白质序列，推测其结构形式和作用机制。图 3-57 是推测的闸门离子通道的一般结构和作用方式。

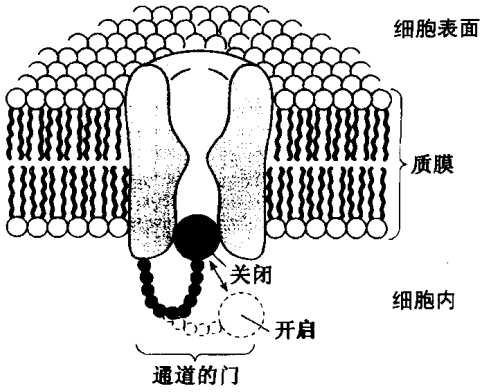


图 3-57　闸门离子通道的结构和作用方式
（引自 Wolfe，1993）

3.5.2.5　载体蛋白与促进扩散

另外一种形式的促进扩散是通过载体蛋白（carrier protein）。与通道蛋白不同，载体蛋白需要同被运输的离子和分子结合，然后通过自身的构型变化或移动完成物质运输。载体蛋白促进扩散时同样具有高度的特异性，其上有结合点，只能与某一种物质进行暂时性、可逆性的结合和分离。而且，一个特定的载体只运输一种类型的化学物质，甚至一种分子或离子。

载体蛋白既参与被动的物质运输，也参与主动的物质运输。由载体蛋白进行的被动物质运输，不需要 ATP 提供能量。前面所讨论的膜运输蛋白具有酶的类似性质，主要就是指载体蛋白，因为通道蛋白上没有与被运输物质结合的位点，而载体蛋白促进扩散时一定要同被运输的物质结合，所以它对物质的转运过程具有类似于酶与底物作用的动力学曲线，可被类似物竞争性抑制，但与酶不同的是，载体蛋白不对转运分子作任何共价修饰。

葡萄糖是通过载体蛋白进行促进扩散的典型例子。运输葡萄糖的载体蛋白主要是通过构型的变化将葡萄糖运输到细胞内，红细胞质膜上有很多这种载体蛋白。运输葡萄糖的载体蛋白有两种构型，一种构型朝向细胞表面暴露出与葡萄糖的结合位点，当有葡萄糖与其结合时，运输蛋白的构型发生变化，这样与葡萄糖结合的位点朝向细胞质面，此时葡萄糖与运输蛋白的结合亲和力降低，从而被释放到细胞质中。当葡萄糖被释放后，运输蛋白又恢复到原来的构型，进行下一轮循环（图 3-58）。

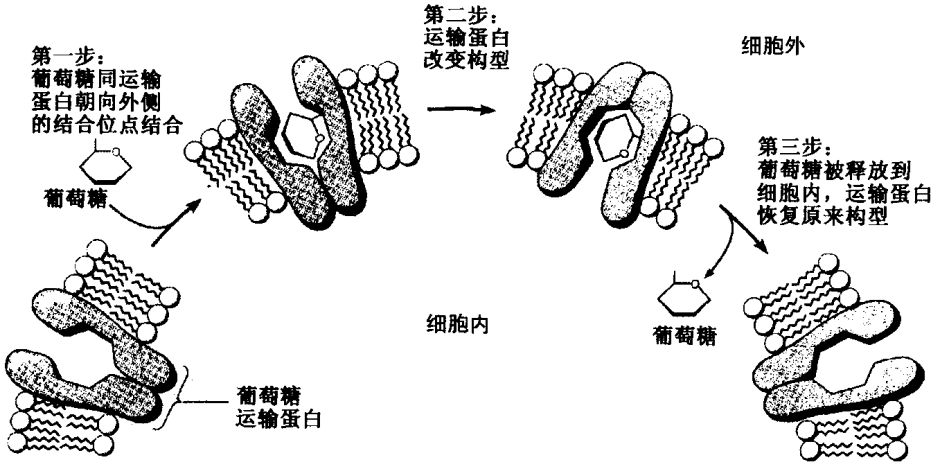


图 3-58　红细胞质膜中运输蛋白促进葡萄糖扩散示意图（引自 Becker *et al.*，1996）

大多数脊椎动物的细胞质膜上有运输葡萄糖的载体蛋白，同时还有与其他六碳糖相关的运输蛋白。另外还发现哺乳动物细胞至少有 5 种不同形式的葡萄糖运输蛋白，分别由不同的基因编码。

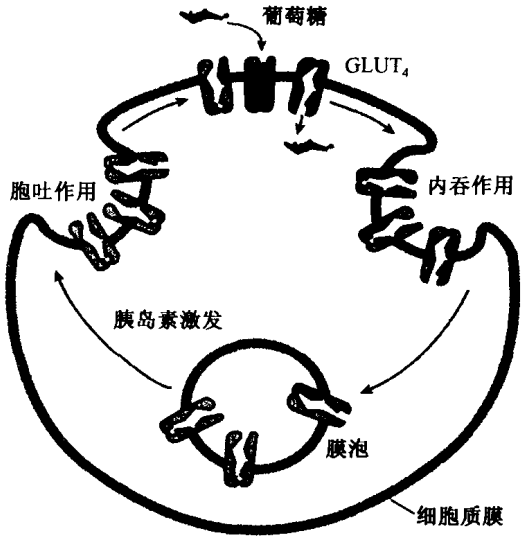


图 3-59　在肌细胞和脂肪细胞中胰岛素对葡萄糖吸收的调节（引自 Karp，1996）

细胞对葡萄糖的摄取受胰岛素的调节。胰岛素是内分泌细胞产生的一种激素，它对于维持血糖的适当水平起关键作用。当血液中葡萄糖的水平增高时，激发胰岛素的分泌，胰岛素促使葡萄糖被各种靶细胞吸收，特别是骨骼肌和脂肪细胞吸收。胰岛素应答细胞具有葡萄糖运输蛋白的异构体 GLUT4。在胰岛素浓度低的时候，细胞表面只有很少的促进葡萄糖运输蛋白，但在细胞质的膜泡膜中却有大量的运输蛋白存在。当血液中葡萄糖浓度升高时，胰岛素的水平也随之提高，胰岛素作用于靶细胞，使膜泡中的葡萄糖运输蛋白转移到质膜中，随后将葡萄糖运输到细胞内（图 3-59）。

糖尿病主要是由胰岛素活性缺陷引起的。儿童的糖尿病（I 型糖尿病）通常是由人体自身合成胰岛素的细胞方面的问题影响胰岛素合成的缺陷所引起，可通过注射胰岛素进行治疗。成年人的糖尿病（II 型糖尿病），其胰岛素的水平是正常的，但是它们的靶细胞对胰岛素不产生应答，有可能是胰岛素受体的问题，或是 GLUT4 运输蛋白的缺陷。

3.5.2.6　水的被动运输

水是一种特别的物质，因为水分子虽然不溶于脂，并且具有极性，但也很容易通过膜。

大多数水是直接通过脂双层进入细胞的，有部分水是通过蛋白通道进行扩散的。水的通道蛋白称为水通道蛋白（aquaporin），在动物和植物细胞中已经发现几种不同的水通道蛋白。在动物细胞中已经鉴定了水通道蛋白家族中的 6 个成员，在植物中发现了具有类似功能的蛋白质。膜的水通道蛋白 AQP1* 是 1988 年发现的，开始将这种蛋白质称为通道形成整合蛋白（CHIP），是人的红细胞膜的一种主要蛋白。它可以使红细胞快速膨胀和收缩以适应细胞间渗透性的变化。AQP1 蛋白也存在于其他组织的细胞中。AQP1 及它的同系物能够让水自由通过（不必结合），但是不允许离子或是其他的小分子（包括蛋白质）通过（图 3-60）。

AQP1 是由四个相同的亚基构成，每个亚基的分子质量为 28kDa，每个亚基有 6 个跨膜结构域，在跨膜结构域 2 与 3、5 与 6 之间有一个环状结构，是水通过的通道。另外，AQP1 的

* 因为 AQP1 蛋白的氨基端和羧基端是完全对称的，所以图中所示的 8 个单位应是 4 个亚基，即每两个为一个对称的亚基。

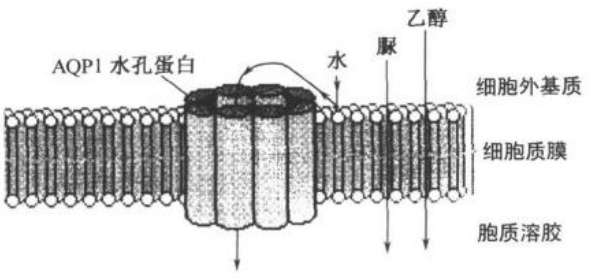


图 3-60　AQP1 水通道蛋白

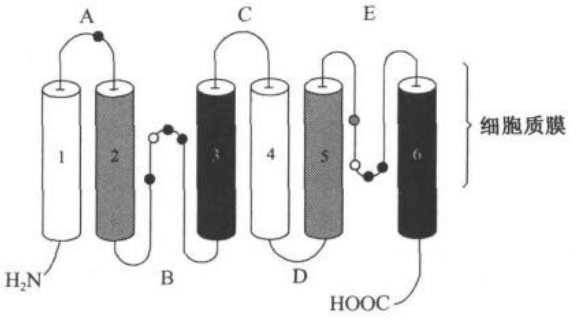


图 3-61　水通道蛋白的跨膜结构域
该蛋白的氨基端与羧基端是完全对称，即 1 和 4、2 和 5、3 和 6 完全对称。

氨基端和羧基端的氨基酸序列是严格对称的，因此，同源跨膜区（1 和 4、2 和 5、3 和 6）在质膜的脂双层中的方向相反（图 3-61）。AQP1 对水的通透性受氯化汞的可逆性抑制，对汞的敏感位点是结构域 5 与 6 之间的 189 位的半胱氨酸。其他几种 AQP1 与肾功能有关。

3.5.3　主动运输

被动运输只能将物质从高浓度向低浓度方向运输，趋向于细胞内外的浓度达到平衡。实际上，细胞内外的物质浓度差别很大，即使在细胞内，不同物质间的浓度差别也很大，浓度的差异是维持细胞生命活动所必须的，仅有被动运输是不可能建立这些差异，也不可能维持细胞内物质浓度的稳定。因此需要有主动的运输方式，保证细胞内物质的稳定，并建立不同的浓度梯度。

3.5.3.1　主动运输的意义

主动运输涉及物质输入和输出细胞和细胞器，并且能够逆浓度梯度或电化学梯度。这种运输对于维持细胞和细胞器的正常功能来说起 3 个重要作用：第一是保证了细胞或细胞器从周围环境中或表面摄取必需的营养物质，即使这些营养物质在周围环境中或表面的浓度很低；第二，能够将细胞内的各种物质，如分泌物、代谢废物以及一些离子排到细胞外，即使这些物质在细胞外的浓度比细胞内的浓度高得多；第三，能够维持一些无机离子在细胞内恒定和最适的浓度，特别是 K^+、Ca^{2+} 和 H^+ 的浓度。概括地说，主动运输主要是维持细胞内环境的稳定，以及在各种不同生理条件下细胞内环境的快速调整。如果说被动运输是减少细胞与周围环境的差别的话，主动运输则是努力创造差别，维持生命的活力。

3.5.3.2　主动运输的特点

主动运输是由运输蛋白介导的物质运输方式，能够使物质从低浓度向高浓度流动，质膜具有一定的“主动作用”，但是需要消耗细胞的代谢能。所以主动运输具有 4 个基本的特点：①逆梯度运输；②依赖于膜运输蛋白；③需要代谢能，并对代谢毒性敏感；④具有选择性和

特异性。

离子的跨膜运输是生物学中一个非常重要的问题。细胞能够维持各种离子在细胞内的不同浓度（表 3-5），这些离子的浓度差异对于细胞的生存和行使功能至关重要。Na^+、K^+、Ca^{2+}、Cl^-等无机离子以及 H^+质子在细胞环境中是非常重要的，它们的跨膜运输对于一些细胞来说是生命的基本保证。例如动物细胞将 Na^+泵出细胞外，维持细胞内 Na^+的低浓度，这样可帮助细胞维持细胞膜内外渗透压的平衡，如果没有这种平衡，细胞就会吸水膨胀直至破裂。细胞质膜和细胞内膜结构中内外离子的浓度差主要是靠主动运输来建立和维持，也就是说，主动运输是建立和维持细胞与环境之间的浓度梯度或电化学梯度。

表 3-5　典型动物细胞内外离子浓度的比较

成分	细胞内浓度/（mmol/L）	细胞外浓度/（mmol/L）
阳离子		
Na^+	5～15	145
K^+	140	5
Mg^{2+}*	0.5	1～2
Ca^{2+}*	10^{-7}	1～2
阴离子		
Cl^-	5～15	110
固定的阴离子**	高	0

* 表中给出的 Ca^{2+}和 Mg^{2+}的浓度是游离存在于胞质溶胶中的浓度；Mg^{2+}在细胞中的总浓度为 2mmol/L；Ca^{2+}则是 1～2mmol/L，它们大多是与蛋白质结合在一起的，Ca^{2+}则存在于细胞器中。

** 指细胞内存在的带负电的有机分子，它们不能通过细胞质膜。

主动运输是消耗代谢能的运输方式。有 3 种不同的直接能量来源（表 3-6），首先是 ATP，这是大多数 P 型泵所需要的，如 Na^+/K^+泵、H^+泵等。另外一种能量来源是光能，如细菌的视紫红质就是吸收光能，诱导构型变化，运输 H^+质子。另外在细菌的基团转运中，磷酸烯醇式丙酮酸提供能源。主动运输除了直接利用能量外，还有间接利用能量的。线粒体内膜和叶绿体类囊体膜中的 ATP 合酶主要是利用 H^+质子梯度的动力势，而 Na^+与葡萄糖的同向协同运输，则是利用 Na^+离子梯度，而这种浓度梯度实际上是 Na^+/K^+泵运输时的副产品。

表 3-6　主动运输中能量来源

载体蛋白	功能	能量来源
直接能源		
Na^+-K^+泵	Na^+的输出和 K^+的输入	ATP
细菌视紫红质	H^+从细胞中主动输出	光能
磷酸化运输蛋白	细菌对葡萄糖的运输	磷酸烯醇式丙酮酸
间接能源		
Na^+、葡萄糖泵协同运输蛋白	Na^+、葡萄糖同时进入细胞	Na^+梯度
F_1-F_0 ATPase	H^+质子运输	H^+质子梯度

同促进扩散一样，载体蛋白进行的主动运输也具有选择性和特异性，如 Na^+/K^+泵只将

Na^+泵出细胞外，将K^+泵进细胞内，维持细胞内K^+的高浓度和Na^+的低浓度，并且Na^+/K^+泵只受特定条件的调节。另外各种泵的分布也是不均一的，有的存在于细胞器的膜上（如F_1-F_0 ATPase），有的只存在于动物细胞质膜中（如Na^+/K^+泵）各自担任的特殊运输任务。

3.5.3.3 参与主动运输的ATPase的类型

在被动运输中，有些分子不需要膜运输蛋白的帮助就可直接通过脂双层进入细胞或膜细胞器，但主动运输全部需要膜蛋白的帮助，因此是载体蛋白依赖性的。不仅如此，在被动运输的促进扩散中，膜运输蛋白虽然也可称为透性酶，但并不具有真正的酶活性，不能起催化反应，只是通过变构作用将物质从高浓度向低浓度运输。但在主动运输中，载体蛋白本身就是酶，能够催化某种反应，如水解ATP使自身磷酸化，然后利用ATP水解释放的能量将离子或分子从低浓度运向高浓度。所以在主动运输中，不仅需要膜运输蛋白的存在，而且需要这些运输蛋白具有活性，否则是不能进行物质的主动运输。

参与主动运输的载体蛋白常被称为泵，这是因为它们能利用能量做功。由于它们消耗的代谢能多数来自ATP，所以又称它们为某某ATPase。共有4种类型的运输ATPase，或称运输泵。

P型泵（P-type pump），或称P型ATPase。此类运输泵运输时需要磷酸化（P是phosphorylation的缩写），包括Na^+/K^+泵、Ca^{2+}泵。

V型泵（V-type pump），或称V型ATPase，主要位于小泡的膜上（V代表vacuole或vesicle），如溶酶体膜中的H^+泵，运输时需要ATP供能，但不需要磷酸化。

F型泵（F-type pump），或称F型ATPase。这种泵主要存在于细菌质膜、线粒体膜和叶绿体的膜中，它们在能量转换中起重要作用，是氧化磷酸化或光合磷酸化偶联因子（F即factor的缩写）。F型泵工作时不会消耗ATP，而是将ADP转化成ATP，但是它们在一定的条件下也会具有ATPase的活性。

图3-62是上述3种运输泵的结构模式图。

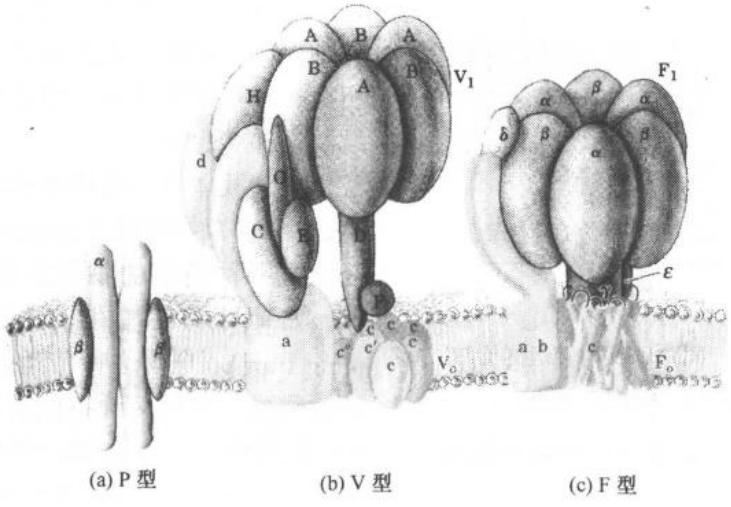


图3-62 P型、V型和F型运输泵的结构（引自Nelson *et al.*，2000）

ABC型泵，又称ABC运输蛋白（ATP-binding cassettle transporter），这是一大类以ATP供能的运输蛋白，已发现了100多种，存在范围很广，包括细菌和人。

表3-7对上述4种运输泵的基本性质进行了比较。

表3-7　4类ATP驱动的离子和小分子运输泵的比较

类型	运输物质	结构与功能特点	存在的部位
P型	H^+、Na^+、K^+、Ca^{2+}	通常有大小两个亚基，大亚基被磷酸化，小亚基调节运输。	H^+泵：存在于植物、真菌和细菌的质膜；Na^+/K^+：存在于动物细胞的质膜；H^+/K^+泵：存在于哺乳动物胃细胞表层质膜；Ca^{2+}泵：存在于所有真核生物的质膜和肌细胞的肌质网膜。
F型	只是H^+	有多个跨膜亚基，建立H^+的电化学梯度，合成ATP。	细菌的质膜、线粒体内膜、叶绿体的类囊体膜。
V型	只是H^+	多个跨膜亚基，亚基的细胞质部分可将ATP水解，并利用释放的能量将H^+运输到囊泡中，使之成为酸性环境。	植物、酵母和其他真菌的液泡膜；动物细胞的溶酶体和内体的膜；某些分泌酸性物质的动物细胞质膜（如破骨细胞和肾管状细胞）。
ABC型	离子和各种小分子	两个膜结构域形成水性通道，两个细胞质ATP结合结构域与ATP水解及物质运输相偶联。不同结构域可以位于同一个亚基，也可位于不同的亚基。	细菌质膜（运输氨基酸、糖和肽）；哺乳动物内质网膜（运输与MHC蛋白相关的抗原肽）；哺乳动物细胞质膜（运输小分子、磷脂、小的类脂分子）。

3.5.3.4　主动运输的方向

主动运输的方向，实际上是载体蛋白的运输方向。在讨论参与主动运输的各种酶的运输方向时，应考虑3个问题：一是转运的能力，即只转运一种离子或分子还是能够同时转运两种不同的离子或分子；二是运输的空间方向，即是将离子或分子从细胞内运向细胞外，还是相反；三是浓度方向，即逆浓度梯度运输还是顺浓度梯度运输。

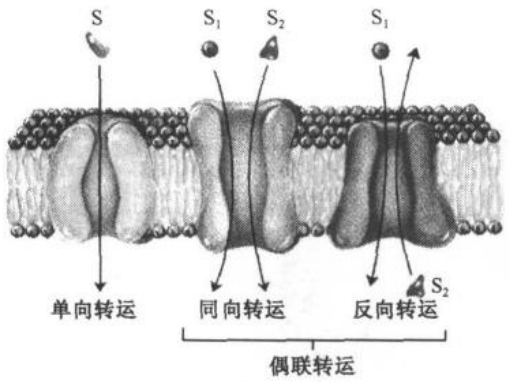


图3-63　单向、同向和反向转运的比较
（引自 Nelson *et al.*，2000）

根据载体对物质转运的能力分为两类（图3-63）：①单向转运（uniport），这类运输蛋白只能将一种类型的物质从膜的一侧运向另一侧，如葡萄糖运输蛋白。②偶联转运（coupling transport），这种转运蛋白能够同时转运两种物质，如果两种物质向同一方向运输，则称为同向转运（symport），例如葡萄糖和Na^+的偶联运输，它是由Na^+梯度驱动的。如果同时转运的两种物质是相反的方向，则称为反向转运（antiport），如心肌细胞中Na^+与Ca^{2+}的交换，也是由Na^+梯度驱动的。

3.5.3.5 P型泵的作用机制

运输离子的P型泵称为P型离子泵，它们都是跨膜蛋白，并且是由一条多肽完成所有与运输有关的功能，包括ATP的水解、磷酸化和离子的跨膜运输。通过基因克隆技术克隆了一些P型泵的基因，经序列分析发现它们序列有相似性，说明是由同一祖先进化而来。

P型离子泵的种类很多，且都具有专一性，运输不同的离子，常称为某离子泵，如Na^+/K^+泵、Ca^{2+}泵等。

Na^+/K^+泵（Na^+/K^+ pump，Na^+/K^+-ATPase）

Na^+/K^+泵是动物细胞中由ATP驱动的将Na^+输出到细胞外同时将K^+输入细胞内的运输泵，又称Na^+泵或Na^+/K^+交换泵。实际上是一种Na^+/K^+-ATPase。Na^+/K^+-ATPase已分离纯化，是由两个大亚基（α亚基）和两个小亚基（β亚基）组成。α亚基是跨膜蛋白，在膜的内侧有ATP结合位点，细胞外侧有乌本苷（ouabain）结合位点；在α亚基上有Na^+和K^+结合位点（图3-64）。

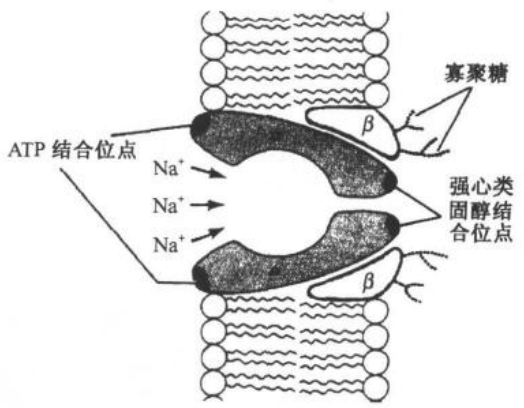


图3-64 Na^+/K^+-ATPase的结构
（引自Becker *et al*., 1996）

Na^+/K^+-ATPase对Na^+/K^+的运输分为六个过程：①在静息状态，Na^+/K^+泵的构型使得Na^+结合位点暴露在膜内侧。当细胞内Na^+浓度升高时，3个Na^+与该位点结合；②由于Na^+的结合，激活了ATP酶的活性，使ATP分解，释放ADP，α亚基被磷酸化；③由于α亚基被磷酸化，引起酶发生构型变化，于是与Na^+结合的部位转向膜外侧，并向胞外释放3个Na^+；④膜外的两个K^+同α亚基结合；⑤K^+与磷酸化的Na^+/K^+-ATPase结合后，促使酶去磷酸化；⑥去磷酸化后的酶恢复原构型，于是将结合的K^+释放到细胞内（图3-65）。每水解一个ATP，运出3个Na^+，输入2个K^+。Na^+/K^+泵工作的结果，使细胞内的Na^+浓度比细胞外低10～30倍，而细胞内的K^+浓度比细胞外高10～30倍。由于细胞外的Na^+浓度高，且Na^+是带正电的，所以Na^+/K^+泵使细胞外带上正电荷。

Na^+/K^+泵具有3个重要作用：一是维持了细胞内适当的Na^+/K^+浓度，抵消了Na^+/K^+的扩散作用；二是在建立细胞质膜两侧Na^+浓度梯度的同时，为葡萄糖协同运输泵提供了驱动力；三是Na^+泵建立的细胞膜电位，为神经和肌肉电脉冲传导提供了基础。

临床上用毛地黄治疗充血性心力衰竭，其机制可能是通过毛地黄对心肌细胞Na^+/K^+-ATPase的抑制。在正常情况下，心脏的收缩是由肌细胞胞质中Ca^{2+}浓度瞬息增加触发的。然后，可通过几种方式将Ca^{2+}除去，包括细胞质膜的逆向Na^+/Ca^{2+}离子（是由Na^+梯度驱动的）交换。毛地黄是一种ATPase抑制剂，可降低Na^+的梯度，结果，Ca^{2+}就不能有效地除去，细胞内Ca^{2+}浓度的增加，增强了心肌的收缩活性。

另外少量的乌本苷能够抑制Na^+/K^+泵的活性，而Mg^{2+}对Na^+/K^+泵具有激活作用。

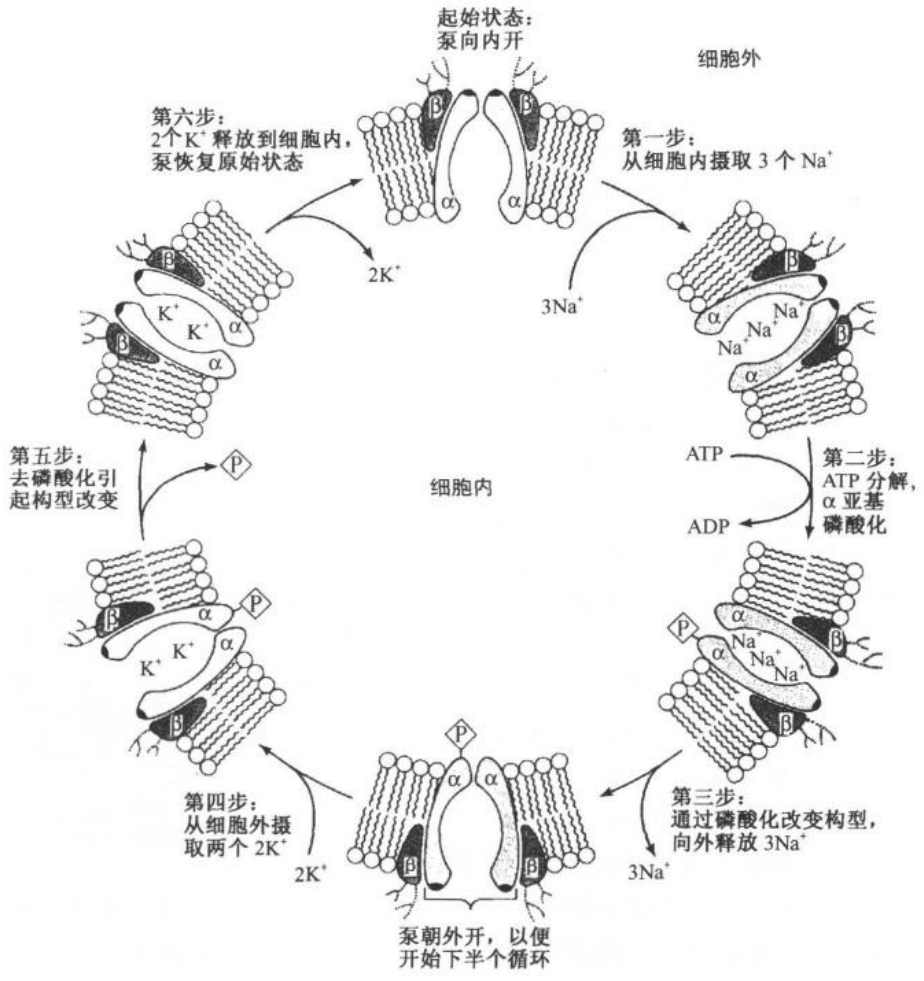


图 3-65　Na^+/K^+-ATPase 工作原理示意图（引自 Becker *et al*., 1996）

Ca^{2+}泵（Ca^{2+} pump，Ca^{2+}-ATPase）

所有真核生物的细胞质膜中都含有 Ca^{2+}-ATPase，它每水解一个 ATP 将两个 Ca^{2+} 从胞质溶胶输出到细胞外。Ca^{2+}-ATPase 也存在于肌细胞的内质网膜及原核生物的细胞质膜中。Ca^{2+}-ATPase 将 Ca^{2+} 泵出细胞质，使 Ca^{2+} 在细胞内维持低水平从而建立 Ca^{2+} 梯度。存在于肌细胞的肌质网上的 Ca^{2+} 泵可以将 Ca^{2+} 从细胞质运到肌质网中储存。通过 Ca^{2+}-ATPase 建立的 Ca^{2+} 梯度能够控制细胞的许多活动，如肌收缩、分泌和微管装配。Ca^{2+}-ATPase 的活性受 Ca^{2+} 的触发，这些 Ca^{2+} 可能是由于质膜和 ER 膜的电位闸门通道和配体闸门通道的扩散进入到细胞质膜中。正常情况下，Ca^{2+}-ATPase 是自我抑制的。

Ca^{2+} 泵的工作原理类似于 Na^+/K^+-ATPase。在细胞质膜的一侧有同 Ca^{2+} 结合的位点，一次可以结合两个 Ca^{2+}，Ca^{2+} 结合后使酶激活，并结合上一分子 ATP，伴随 ATP 的水解和酶被磷酸化，Ca^{2+} 泵构型发生改变，结合 Ca^{2+} 的一面转到细胞外侧，由于结合亲和力低 Ca^{2+} 被释放，此时酶发生去磷酸化，构型恢复到原始的静息状态。

Ca^{2+}-ATPase 有 10 个跨膜结构域，在细胞质膜内侧有两个大的细胞质环状结构，第一个

环位于跨膜结构域 2 和 3 之间，第二个环位于跨膜结构域 4 和 5 之间。在第一个环上有 Ca^{2+} 结合位点；在第二个环上有激活位点，包括 ATP 的结合位点。Ca^{2+}-ATPase 的氨基端和羧基端都在细胞的内侧，羧基端含有抑制区域。在静息状态，羧基端的抑制区域同环 2 的激活位点结合，使泵失去功能，这就是自我抑制。

Ca^{2+}-ATPase 有两种激活机制，一种是受激活的 Ca^{2+}/钙调蛋白（CaM）复合物的激活，另一种是被蛋白激酶 C 激活。当细胞内 Ca^{2+} 浓度升高时，Ca^{2+} 同钙调蛋白结合，形成激活的 Ca^{2+}/钙调蛋白复合物，该复合物同抑制区结合，释放激活位点，泵开始工作。当细胞内 Ca^{2+} 浓度下降时，CaM 同抑制区脱离，抑制区又同激活位点结合，使泵处于静息状态。在另一种情况下，蛋白激酶 C 使抑制区磷酸化，从而失去抑制作用；当磷酸酶使抑制区脱磷酸，抑制区又同激活位点结合，起抑制作用。

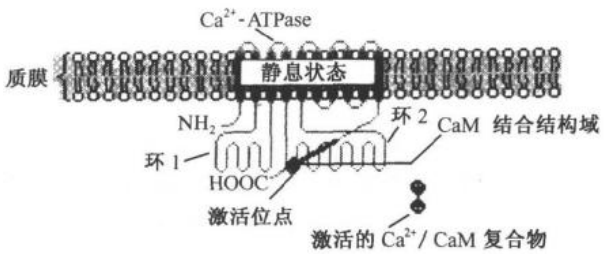


图 3-66　Ca^{2+}-ATPase 的结构和功能位点

由上可以看出，在 Ca^{2+}-ATPase 的羧基端有 3 个功能位点（区域）：同激活位点结合区、同 CaM 结合区、磷酸化位点（图 3-66）。

3.5.3.6　协同转运

协同转运（cotransport）又称偶联运输，它不直接消耗 ATP，但要依赖离子泵建立的电化学梯度，所以又将离子泵称为初级主动运输（primary active transport），将协同运输称为次级主动运输（secondary active transport）。

动物细胞中，质膜上的钠泵和载体协作完成葡萄糖、氨基酸等的逆浓度梯度的协同运输。运输的机制是：载体蛋白有两个结合位点，可分别与细胞外的 Na^+、糖（氨基酸）等结合。Na^+ 和葡萄糖分别与载体结合后，载体蛋白借助 Na^+/K^+ 泵运输时建立的电位梯度，将 Na^+ 与葡萄糖（或氨基酸）同时运输到细胞内。在细胞内释放的 Na^+ 又被 Na^+/K^+ 泵泵出细胞外维持 Na^+ 的电位梯度（图 3-67）。

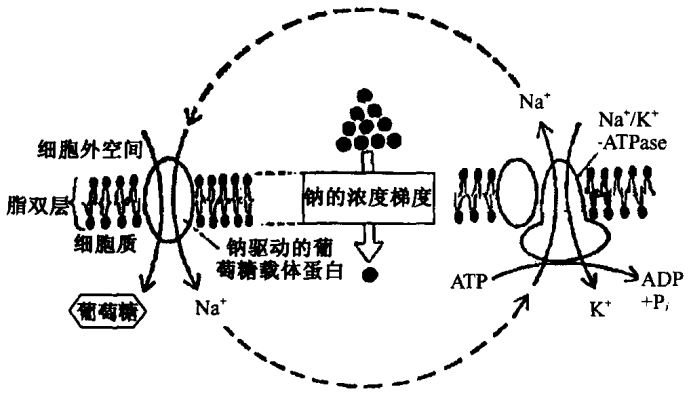


图 3-67　葡萄糖与 Na^+ 的协同运输

动植物细胞可以利用各种离子泵进行离子的运输，维持离子在细胞内外的浓度差别。对于细胞所需的大分子及需要排出的高分子量分泌物则要靠另外的机制进行运输，包括胞吞作用（endocytosis）和胞吐作用（exocytosis），将在第 9 章中讨论。

3.5.3.7 细菌中的主动运输

在细菌中发现一些特殊的主动运输方式，如磷酸化运输（phosphorylating transport）、运输 ATP 酶、细菌视紫红质（bacteriorhodopsin）等，这些运输方式的能量来源各不相同。

磷酸化运输

磷酸化运输方式最早发现于细菌中，后在动物细胞中也发现有类似的跨膜运输方式，又称为基团转运。其机制是通过对被转运到细胞内的分子进行共价修饰（主要是进行磷酸化）使其在细胞中始终维持“较低”的浓度，从而保证这种物质不断地沿浓度梯度从细胞外向细胞内转运。在这种运输系统中，涉及几种酶和一个被称为 HPr 小分子蛋白；被转移的基团是磷酸烯醇式丙酮酸的高能磷酸键上的磷酸基团，运输中所需要的能量则由磷酸烯醇式丙酮酸的高能磷酸键提供。在细菌细胞中，这种运输作用主要是进行一些糖的运输，如乳糖、葡萄糖、甘露醇等（图 3-68）。

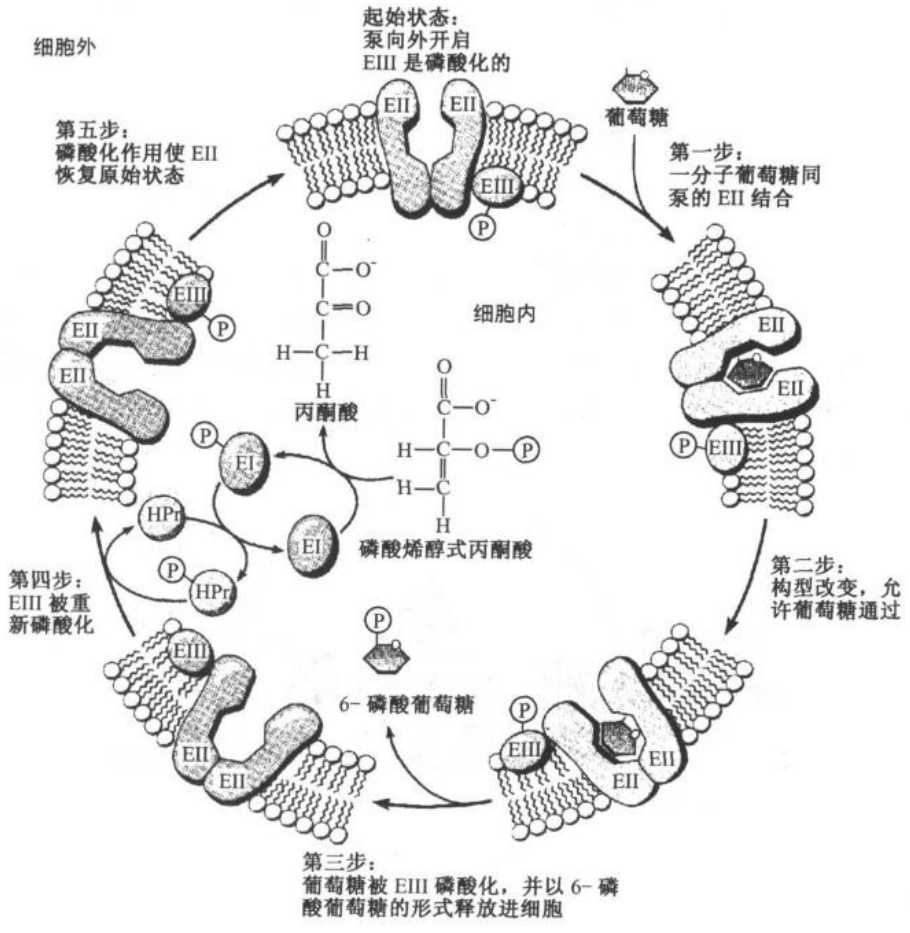


图 3-68 细菌细胞中糖的磷酸化运输（引自 Becker *et al*., 1996）

在该运输模型中，首先将供体磷酸烯醇式丙酮酸的磷酸基团转移到细胞质的酶 I (EI)，然后将磷酸基团转移给 HPr 蛋白，起始步骤对于各种糖的运输都是相同的。第二步要根据被转运的糖而定，如运输的是葡萄糖，HPr 蛋白要将磷酸基转给酶 III (EIII)，再转给位于质膜中的酶 II (EII)，但对于甘露糖的转运则不需 EIII 的参与，所以可直接将磷酸基团转给位于质膜中的 EII；最后由 EII 将磷酸基团转给被运输的糖。EII 和 EIII 对于不同的糖具有特异性。该运输方式中，被转运进入细胞中的糖浓度，从形式上看没有提高，但实质上是提高了，只不过通过磷酸化作用进行了修饰。

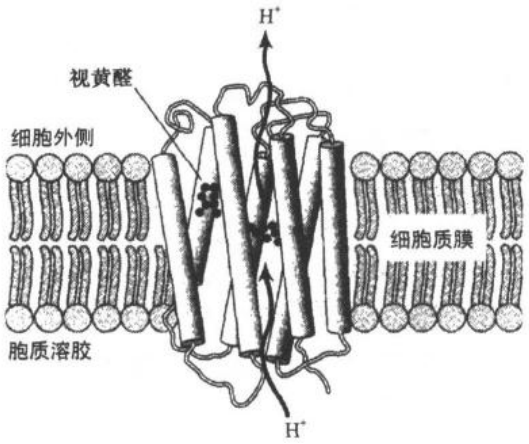


图 3-69　细菌视紫红质的结构
(引自 Kleinsmith *et al.*, 1995)
圆柱形代表 α 螺旋区，视黄醛基团吸收光子，诱导了构型的变化，驱使 H^+ 通过蛋白的中央通道运输。

细菌视紫红质质子泵

嗜盐的厌氧菌 *Halobacterium halobium* 生活在阳光充足的盐水池中。在进化过程中，这种菌的细胞质膜上出现了多种能被光线激活的蛋白质，“紫膜”是该菌质膜上一些特化的区域（斑块），上面只含一种蛋白质，就是细菌视紫红质。该蛋白含有 7 个 α 螺旋，每个螺旋长 3～4nm，在蛋白的中部有几个能够吸收光的

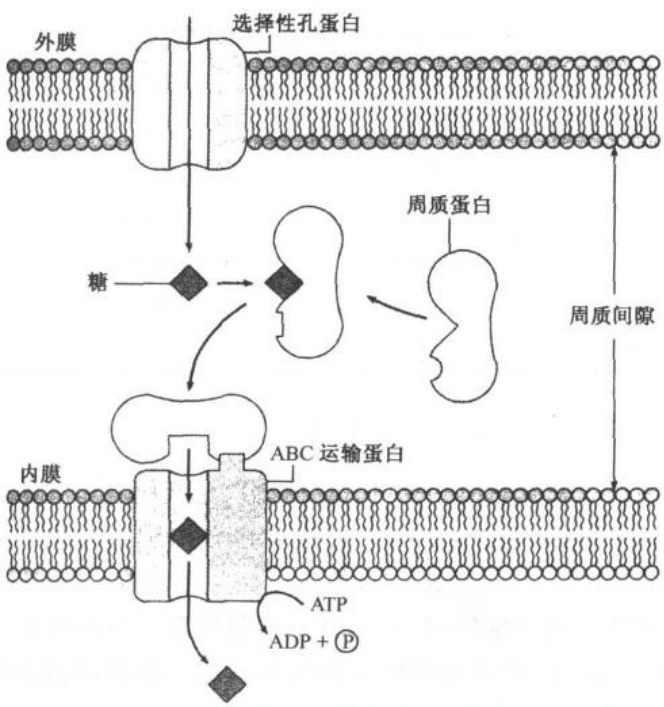


图3-70　*E. coli* 周质空间主动运输示意图(引自 Wolfe, 1993)

视黄醛基团，又称发色基团；当该基团被一个光子激活时，就能引起整个分子的构型发生变化，导致两个 H^+ 从细胞内运送到细胞外（图 3-69）。结果造成了细胞内外的质子浓度差，这种浓度梯度可被另一种膜蛋白用于 ATP 的合成。在这个系统中，H^+ 的运输是由光提供能量。

ABC 运输蛋白的运输作用

ABC 运输蛋白最早在细菌中发现，位于细菌的内膜，主要参与糖、氨基酸和小肽的运输，运输时需要水解 ATP 提供能量（图 3-70）。

糖、氨基酸等物质先通过外膜的选择性孔蛋白进入膜间腔，然后被一种周质结合蛋白所结合。结合蛋白有两个结构域，一个同糖结合，该结构域与糖等物质结合后，会引起另一个结构域发生构型变化并同 ABC 运输蛋白结合。在水解 ATP 供能的情况下，ABC 运输蛋白将糖等运入细胞内。

3.5.4 主动与被动运输、动物与植物主动运输的比较

3.5.4.1 主动与被动运输的比较

细胞质膜中进行的被动运输与主动运输的方式各样，机制也各不相同，概括起来，对那些不带电的小分子可以通过简单扩散的方式透过细胞质膜直接进入细胞，如乙醇、二氧化碳和氧。其他的物质，大多数都可以在通道蛋白或载体蛋白的帮助下进入细胞。被动运输都是顺浓度梯度运输，并且不需要消耗自由能以外的能量。在主动运输中能够逆化学梯度进行运输，但这需要消耗能量，并且需要载体蛋白。现将物质主要运输方式列于表 3-8。

表 3-8 不同运输机制的主要特性

性 质	简单扩散	促进扩散	主动运输
参与运输的膜成分	脂	蛋白	蛋白
被运输的物质是否需要结合	否	是	是
能量来源	浓度梯度	浓度梯度	ATP 水解或浓度梯度
运输方向	顺浓度梯度	顺浓度梯度	逆浓度梯度
特异性	无	有	有
运输的分子高浓度时的饱和性	无	有	有

3.5.4.2 动物细胞和植物细胞主动运输的比较

动物细胞和植物细胞不仅结构有所差别，载体蛋白也有所不同（图 3-71）。动物细胞质膜上有 Na^+/K^+-ATPase，并通过对 Na^+、K^+ 的运输建立细胞的电化学梯度；但在植物细胞（包括细菌细胞）的质膜中没有 Na^+/K^+-ATPase，代之的是 H^+-ATPase，并通过对 H^+ 的运输建立细胞的电化学梯度，使细胞外 H^+ 的浓度比细胞内高；与此同时，H^+ 泵在周围环境中创建了酸性 pH，然后通过 H^+ 质子梯度驱动的同向运输，将糖和氨基酸等输入植物的细胞内。在动物细胞溶酶体膜和植物细胞的液泡膜上都有 H^+-ATPase，它们的作用都一样，保持这些细胞器的酸性。

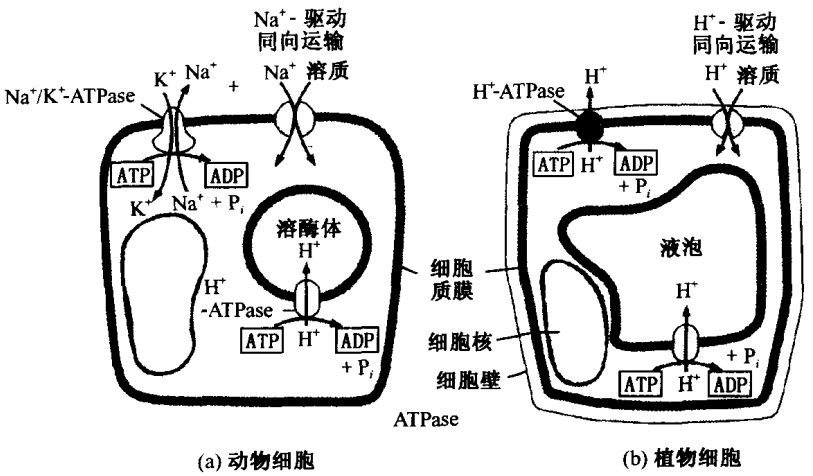


图 3-71　动植物细胞载体介导的物质运输的相似与差异（引自 Alberts *et al*., 1998）

提　要

细胞质膜是细胞的基本结构，生物膜具有界膜和区室化、调节运输、功能定位和组织化、信号检测与传递、能量转换等功能。

细胞结构简单，是研究膜结构的最好材料。红细胞质膜内侧有膜蛋白和纤维蛋白组成的膜骨架，它参与维持细胞质膜的形状并协助质膜完成多种生理功能。

膜的主要成分是膜脂、膜蛋白、膜糖 3 大类。磷脂、鞘脂、胆固醇是主要的膜脂，具有双亲媒性。根据膜蛋白的存在方式可分为整合蛋白、外周蛋白、脂锚定蛋白，细胞质膜的生物学功能主要是由膜蛋白来执行的；可以采用离子型和非离子型的去垢剂来分离膜蛋白。膜糖一般以糖脂或糖蛋白的形式存在，存在于质膜的外侧面。

流动镶嵌模型是目前被广泛接受的细胞质膜的结构模型，它强调了膜的不对称性和流动性。膜脂、膜蛋白及膜糖分布的不对称性导致了膜功能的不对称和方向性，保证了生命活动的高度有序性。流动性包括膜脂的侧向扩散、旋转运动、翻转运动和膜蛋白的随机移动、定向运动、局部扩散等，膜的流动性与细胞质膜的酶活性、物质运输、信号转导、能量转换、细胞周期、发育及衰老等过程有很大关系。可以通过人鼠细胞融合实验、淋巴细胞的成斑成帽反应、光脱色荧光恢复技术、电子自旋共振谱技术研究膜的流动性。温度、脂肪酸链长度、不饱和度、胆固醇含量、卵磷脂/鞘磷脂比值以及影响膜蛋白运动的因素都能够影响膜的流动性。

物质跨膜运输是细胞质膜的基本功能，分为被动运输和主动运输。被动运输不消耗 ATP，且顺浓度梯度，可分为简单扩散和促进扩散，后者需要载体蛋白或通道蛋白的帮助。通道蛋白有电位闸门通道、配体闸门通道、机械闸门通道等。水可以通过简单扩散方式跨膜，也可以通过水通道蛋白协助跨膜。

主动运输的 4 个基本特点是：逆浓度运输、依靠膜运输蛋白、需要消耗 ATP、具有选择性和特异性。参与主动运输的 ATPase 可分为 P 型泵、V 型泵、F 型泵和 ABC 运输蛋白，Na^+/K^+ 泵和 Ca^{2+} 泵均属于典型的 P 型离子泵。

细菌的主动运输有磷酸化运输、细菌视紫红质质子泵、ABC 运输蛋白等。

4 细胞环境与互作

多细胞的生命有机体中的细胞组成不同的组织，在这些组织中，细胞相互间以及细胞与细胞外环境维持着良好的关系。即使是那些同组织没有固定关系的细胞，例如在机体内负责巡逻任务的白血球，它也必须以高度特异的方式同其他细胞以及这些细胞的细胞外基质相互作用。细胞相互间以及细胞与细胞环境的相互作用调节着细胞的迁移、生长以及组织的三维结构。因此，研究和了解细胞与细胞之间、细胞与细胞外物质之间的关系和相互作用对于认识生命现象的本质是十分重要的。

细胞通过表面发生的作用包括细胞识别、细胞黏着、细胞连接、细胞通讯等。由于细胞通讯的内容较多，将在下一章单独讨论，本章主要讨论细胞的表面结构、细胞外基质、细胞识别、细胞黏着和细胞连接等。

4.1 细胞表面

细胞表面（cell surface）在细胞的生命活动中有着十分独特的作用，因为它是细胞同细胞外环境进行物理接触的惟一部位。多细胞生物体中的大多数细胞表面是同它的相邻细胞或细胞外基质联系在一起的。单细胞生物更多的是面对水性环境。在这两类生物中，细胞表面是细胞同外界联系以及与细胞之间和细胞与环境间进行通讯的基本结构。

细胞表面是一个具有复杂结构的多功能体系。在结构上包括细胞被（cell coat）和细胞质膜。动、植物细胞间的连接结构、细菌与植物细胞的细胞壁以及表面的特化结构，如鞭毛等都可看成是表面结构的组成部分。

在功能上，细胞表面是细胞质膜功能的扩展：①它保护细胞，使细胞有一个相对稳定的内环境；②参与细胞内外的物质交换和能量交换；③参与细胞识别、信息的接收和传递；④参与细胞运动；⑤维护细胞的各种形态，并且与免疫、癌变等都有十分密切的关系。

4.1.1 细胞被

由于细胞质膜是细胞的界膜，并且在细胞的生命活动中有着十分重要的作用，如果细胞质膜有丝毫的损伤，其后果是可想而知的。所以，细胞质膜，包括膜蛋白一般不会直接裸露在细胞外，而是由覆盖在细胞表面的保护层保护着，这种保护层即是细胞被。

4.1.1.1 细胞被的结构与组成

细胞被包括细胞质膜中的整合蛋白、某些膜脂以及从质膜伸向外侧的短的糖链。由于这层结构的主要成分是糖，所以又称为糖萼（glycocalyx），或糖被（图 4-1）。糖被通常含有由

细胞分泌出来的细胞外基质，厚约 5nm，其中的糖是与质膜的蛋白质分子、脂类分子共价结合形成糖蛋白和糖脂分子。

糖被通常含有两种主要的成分：糖蛋白和蛋白聚糖（图 4-2）。这些糖蛋白和蛋白聚糖都是在细胞内合成，然后分泌出来并附着到细胞质膜上。

糖蛋白和糖脂的寡糖侧链所含糖基的数量少于 15，但由于可通过共价键形成支链，所以排列方式却是多种多样。

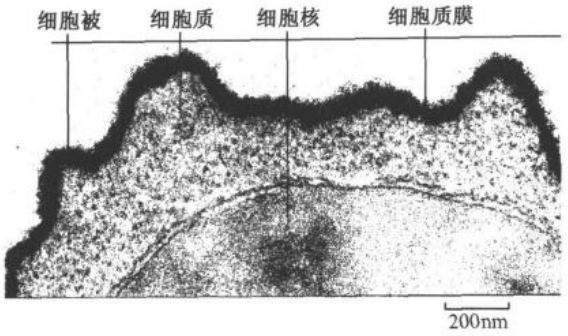


图 4-1　细胞被（引自 Alberts *et al*., 1994）
用钌红染色，电子显微镜观察到的淋巴细胞的细胞被。

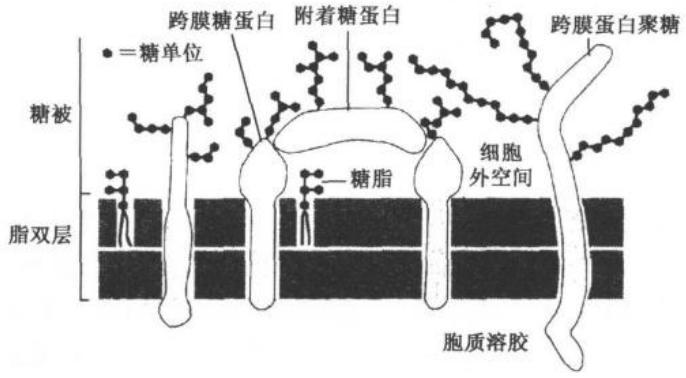


图 4-2　糖被的结构和组成示意图（引自 Alberts *et al*., 1994）
细胞被是由糖脂和整合糖蛋白的寡聚糖链、整合膜蛋白聚糖的多糖以及附着在质膜上的糖蛋白和蛋白聚糖（未显示）的多糖组成。

4.1.1.2　*细胞被的功能*

细胞被的基本功能是起保护作用，如消化道、呼吸道、生殖腺等上皮组织细胞的外被有助于润滑、防止机械损伤，同时又可保护上皮组织不受消化酶的作用和细菌的侵袭。植物和细菌的细胞壁不仅可以保护细胞质膜，同时还赋予细胞以特定的形状。

多年来，一直认为细胞被仅仅是起保护作用，防止机械和化学损伤，使细胞保持相对独立。随着细胞生物学研究方法的发展，发现细胞被除对细胞具有保护作用外，还参与细胞与环境的相互作用，参与细胞与环境的物质交换，细胞增殖的接触抑制、细胞识别等。

细胞被之所以在细胞生命活动中起重要作用，原因是糖链具有惊人数目的异构体。有人计算过：3 个同样的己糖（葡萄糖或半乳糖）可以构成 176 个不同的三糖。3 个不同种类的单糖，所能构成的异构体的数目达 1 056 个。若以血浆糖蛋白中一些常见的糖链为例，则更能说明问题：由 1 个岩藻糖、2 个半乳糖、2 个神经氨酸、3 个甘露糖和 4 个 *N* -乙酰氨基葡萄糖等 12 个单糖组成的一条糖链，可以有 10^{24}个异构体，1 个异构体可携带 1 个信息，那么一条多糖链所携带的信息竟可多至天文数字!

4.1.2 植物的细胞外结构：细胞壁

植物与动物有一个很重要的不同，就是植物没有骨骼系统，但是植物细胞却有相当的强度，如一棵树能够支持千斤大象。赋予植物如此大的强度，不是骨骼，而是植物的细胞壁。植物细胞壁除了给整体植物提供机械强度之外，也保护细胞免遭渗透及机械损伤。另外，植物的细胞壁可以保护植物免受微生物，特别是真菌和细菌的侵染。坚硬的细胞壁对于植物的形态也有决定性的作用。若除去细胞壁，植物细胞就会失去其正常的形态。植物细胞壁是造成植物细胞与动物细胞性质上差异的主要因素。如植物细胞不能迁移，也不可能发育成动物细胞所具有的神经系统。

曾经有人把植物的细胞壁看成是相当惰性的包围在细胞外的细胞分泌物，现代的研究发现植物细胞壁是一个动态结构，能够进行很多活动。例如，与细胞壁有关的酶能够将细胞外的营养转变成能够通过细胞膜进入细胞的小分子化合物。细胞壁也可以作为物质通透的障碍在代谢和分泌过程中起重要作用。

4.1.2.1 细胞壁的化学组成与结构

细胞壁是由大分子构成的复杂的复合物，构成细胞壁的分子是由细胞壁所包围的细胞分泌出来的，从这种意义上来说，植物的细胞壁相当于动物细胞的细胞外基质，所不同的是，动物细胞的细胞外基质的主要成分是蛋白质分子，而植物细胞壁的主要成分是多糖。其中最重要的是纤维素，它赋予植物细胞的硬度和强度，同动物细胞细胞外基质中的胶原具有相似的作用。

纤维素（cellulose）是由葡萄糖构成的多聚体。在细胞壁中，由 50～60 个纤维素分子形成一束，并且相互平行排列，形成长的、坚硬的微纤维（图 4-3，图 4-4），这种微纤维的直径一般约为 5～15nm，长约几微米。纤维素微纤维通常两两堆积在一起形成更大的大纤维，它们的强度达到同类粗细钢管的强度。

不同植物的细胞壁在组成、厚度等方面都有差异，例如棉花的细胞壁几乎全是纤维素纤维构成的，而木本植物的细胞壁纤维素仅占 50%，某些植物幼苗的细胞壁中纤维素的含量不到 1%。

虽然纤维素是细胞壁的关键成分，但是细胞壁不只是纤维素的集合体，还包括其他一些大分子，这些生物大分子大致分为 4 大类：半纤维素、果胶、木质素、糖蛋白。

半纤维素（hemicellulose）是由几种不同类型的单糖构成的异质多聚体，这些糖是五碳糖和六碳糖，包括木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖等。半纤维素木聚糖在木质组织中占总量的 50%，它结合在纤维素微纤维的表面，并且相互连接，这些纤维构成了坚硬的细胞相互连接的网络（图 4-5）。

果胶（pectin）是由半乳糖醛酸和它的衍生物组成的多聚体（图 4-6）。类似动物细胞的黏多糖，很容易形成水合胶。果胶在细胞壁中的作用主要是连接相邻细胞壁，并且形成细胞外基质，将纤维素包埋在水合胶中。

木质素（lignin）是由聚合的芳香醇构成的一类物质，主要存在于木质组织中，其作用是通过形成交织网来硬化细胞壁。木质素主要存在于纤维素纤维之间，具有抗压作用。在木本

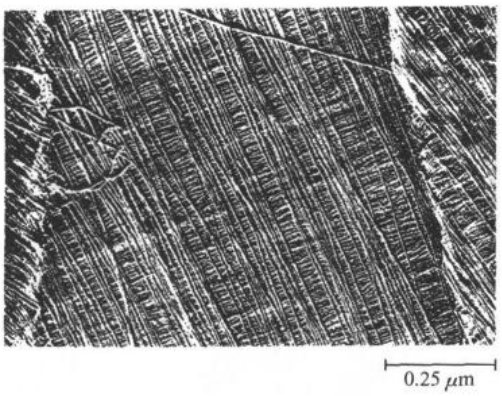


图 4-3　纤维素微纤维的结构

（引自 Becker *et al*., 1996）

此电镜图所示的是绿藻细胞壁中单个纤维素微纤维的结构，每个微纤维的直径是 25nm，由许多侧向排列的纤维素构成。

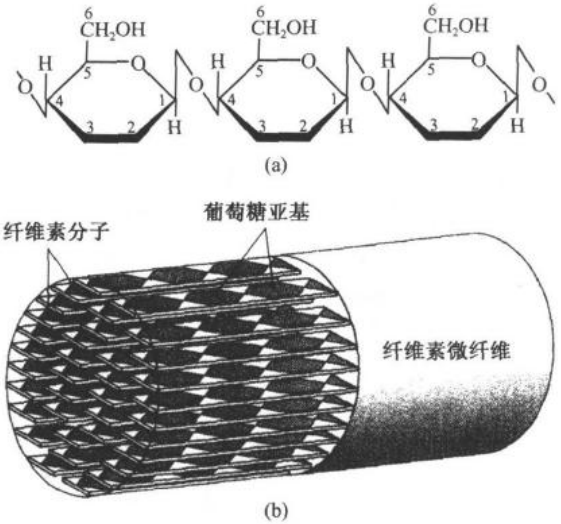


图 4-4　纤维素分子与纤维素微纤维

（引自 Wolfe, 1993）

（a）纤维素分子是由葡萄糖以 β（1→4）连接形成的链状多聚体；（b）由很多的纤维素链组成纤维素微纤维。

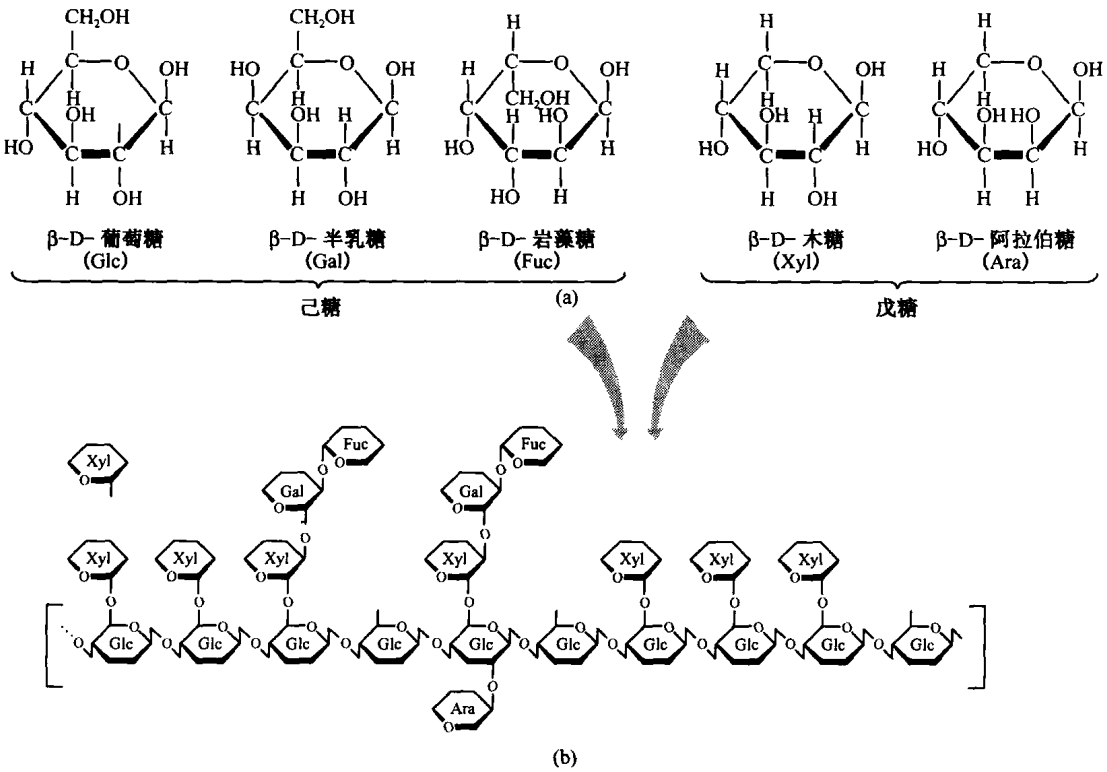


图 4-5　半纤维素的化学组成

（a）组成半纤维素的 5 种单糖；（b）半纤维素可能的结构。

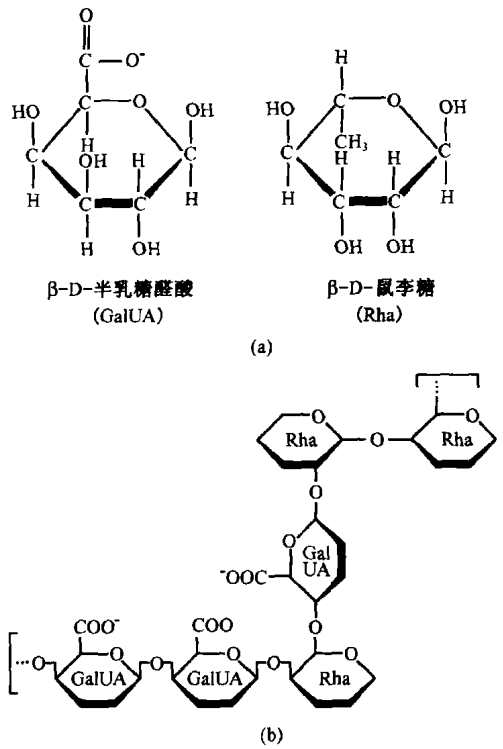


图 4-6 果胶的化学组成和可能的结构
(a) 果胶主要是由半乳糖醛酸和鼠李糖构成；
(b) 果胶可能的结构排列。

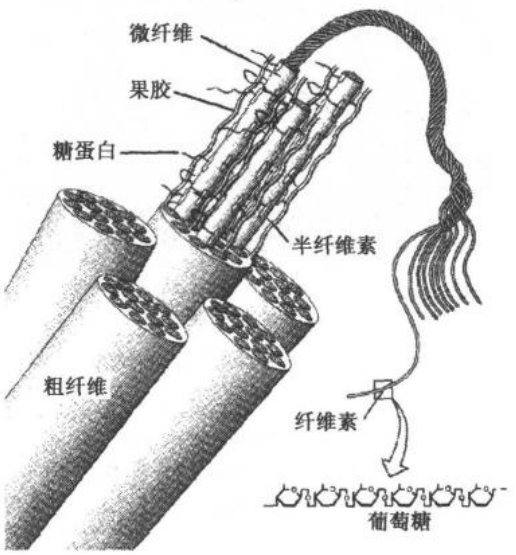


图 4-7 植物细胞壁中纤维素及其他几种主要成分间的关系（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

植物中，木质素占 25%，是世界上第二位最丰富的有机物（纤维素是第一位）。

糖蛋白（glycoprotein）也是植物细胞壁中的重要成分之一，总量占 10%。最重要的一种糖蛋白叫伸展蛋白（extensin），这种蛋白同其他的相关蛋白一起，与纤维素等形成交叉网络，产生一种加固蛋白质-多糖复合物的力。

除了上述成分外，细胞壁中也有少量的脂，包括腊质及其他的脂类。这些脂质常位于细胞壁的外表面，并且形成角质层，保护细胞免受损伤。细胞壁中还有矿物盐，如钙和钾等。细胞壁的结构以及各主要成分间的相互关系示于图 4-7。

4.1.2.2 纤维素微纤维的装配

生化研究显示，纤维素及纤维素微纤维是在细胞质膜上装配的，已通过冷冻断裂技术揭示了其装配过程的某些细节。从冷冻断裂的电镜照片可以看到，新合成的纤维素微纤维在质膜上的位置，像沟状结构（图 4-8a）。

通过冷冻断裂制备的质膜的半层结构，可看到不同大小的蛋白质颗粒被埋在质膜的沟状的一端。这些颗粒成直线性的、平行排列，或者以环形的方式排列，称为玫瑰丛（rosettes），这种成排或成丛的颗粒被认为是利用葡萄糖合成纤维素微纤维的酶复合物（图 4-8b）。

另外，在植物细胞壁的纤维素微纤维装配过程中，微管也有重要作用。1963 年，Ledbetter 和 Porter 发现在形成细胞壁的质膜下有一层微管，后来的研究证实了这一发现。推测在细

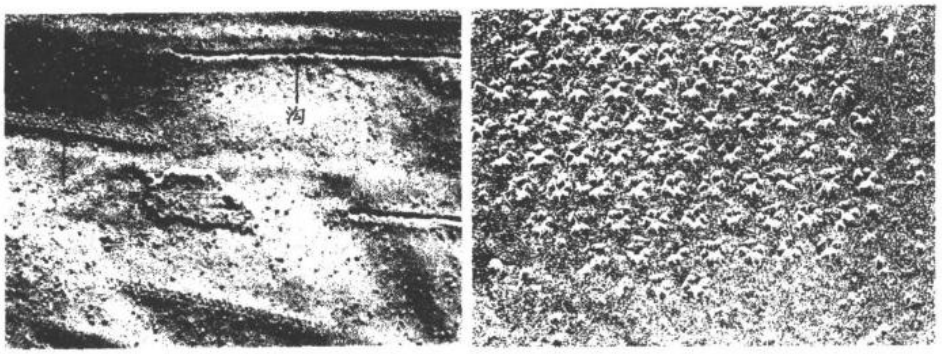


图 4-8　冷冻断裂揭示的纤维素微纤维合成的部位和酶复合物（引自 Wolfe，1993）
(a) 纤维素微纤维在质膜上合成时显示的沟状结构；(b)参与纤维素微纤维合成的酶复合物的丛状排列模式。

胞壁形成时，微管对于指导纤维素微纤维的方向具有重要作用（图 4-9）。

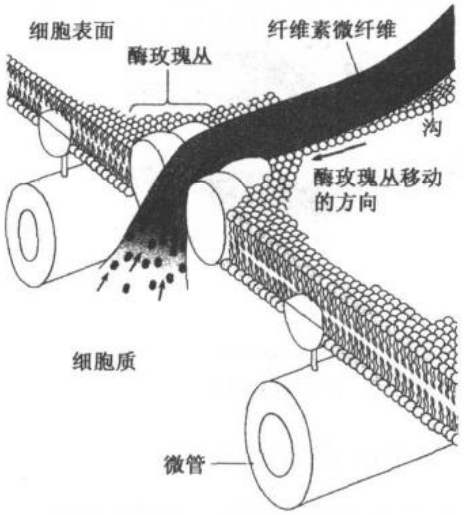


图 4-9　在纤维素微纤维合成装配中，质膜沟、酶丛及微管的关系（引自 Wolfe，1993）

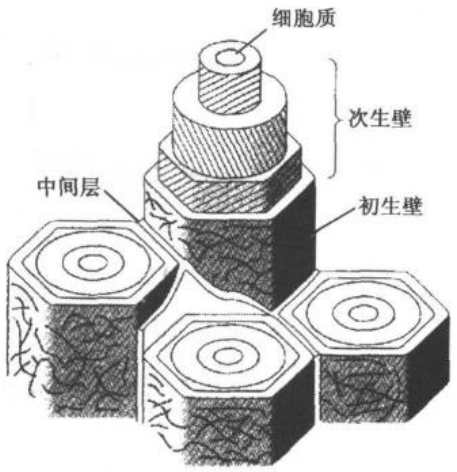


图 4-10　植物细胞壁的层次结构
（引自 Becker *et al*.，1996）
某些植物的细胞壁只有初生壁，有些既有初生壁，也有次生壁。

4.1.2.3　*初生细胞壁与次生细胞壁*

植物有两种类型的细胞壁：初生细胞壁（primary cell wall）和次生细胞壁（secondary cell wall），它们是在不同阶段分泌合成的（图 4-10）。

细胞壁的分泌合成是逐步、分层次进行的，合成越早，最后离开质膜越远。首先形成的是中间层（middle lamella），其构成成分主要是果胶。果胶是相邻两细胞壁所共有的，并且起到将两个细胞连接在一起的作用。

分泌合成的第二个区带称为初生壁，是在细胞生长时期形成的。初生壁的厚度约为 100～200nm，与动物细胞的基膜相当。初生壁由纤维素、半纤维素、果胶和糖蛋白等松散组

成。在初生壁中，果胶对于初生壁的弹性是十分重要的，使细胞在生长过程中进一步扩展。

次生壁是在细胞停止生长后分泌形成的，主要是增加细胞壁的厚度和强度。次生壁位于初生壁的内层，纤维素和木质素是次生壁的主要成分，但基本不含果胶，这样使得次生壁非常的坚硬。次生壁是由几层纤维素微纤维组成，各自形成密集结实的层。

4.1.3 细菌的细胞细胞壁

细菌的细胞具有由细胞质膜、细胞壁等组成的细胞包被（cell envelope）。细菌的细胞壁是细菌细胞最外层的保护性结构，能够抵抗机械损伤、化学损伤以及水的渗透。

根据染色性能，细菌的细胞可分为两种类型：革兰氏阳性（Gram-positive）菌和革兰氏阴性（Gram-negative）菌。这两种细菌除了细胞壁的结构不相同外，革兰氏阳性菌只有一层膜结构，而革兰氏阴性菌具有两层膜结构（图 4-11）。

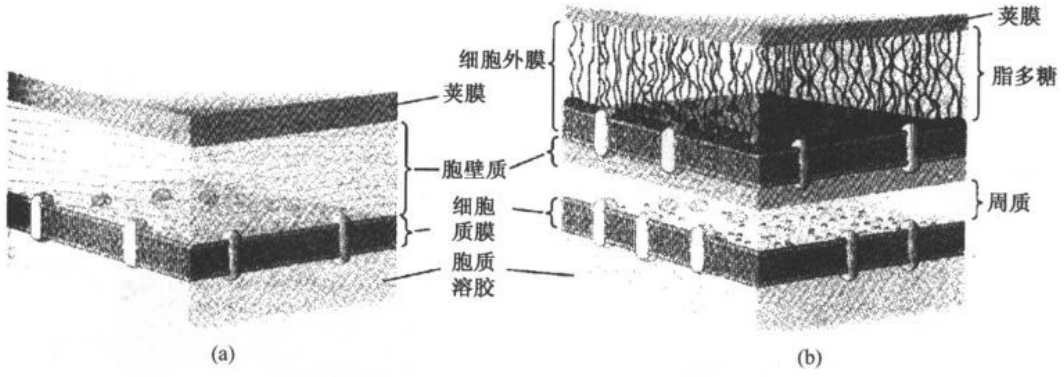


图 4-11 革兰氏阳性菌与革兰氏阴性菌细胞外被的比较（引自 Becker *et al*., 1996）
(a) 革兰氏阳性菌，只有一层膜结构；(b) 革兰氏阴性菌，具有两层膜结构。

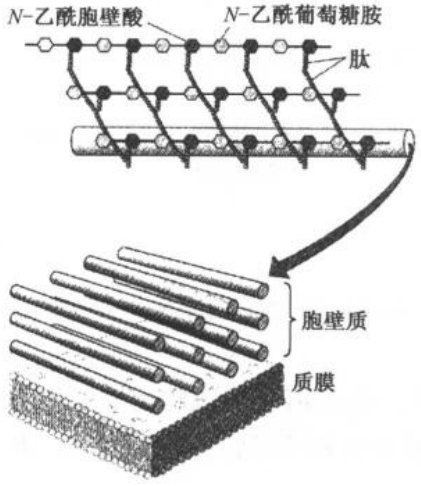


图 4-12 革兰氏阳性菌细胞壁中的胞壁质的结构（引自 Becker *et al*., 1996）
细胞壁由 20～40 层交联网状肽聚糖构成。

4.1.3.1 革兰氏阳性菌的细胞壁

革兰氏阳性菌的细胞壁较厚，它紧挨着细胞质膜的外侧。对分离的革兰氏阳性菌的细胞壁的化学分析发现：含量最多的是一种称为肽聚糖的复合物——胞壁质（murein），或称为肽聚糖（peptidoglycan）。胞壁质的多糖组成主要是由 *N*-乙酰葡萄糖胺和 *N*-乙酰胞壁酸交替连接起来的。这些多糖链通过 *N*-乙酰胞壁酸与短的肽桥结合，最后形成交联的三维网状结构（图 4-12），这种结构大大增强了细胞壁的强度。不仅如此，细胞壁中胞壁质的骨架决定细胞的形态，用溶菌酶水解细胞壁的胞壁质的实验证明了这一点，因为用溶菌酶水解了细菌细胞壁中的胞壁质之后，细菌就全部变成了球形。

革兰氏阳性菌的细胞壁中除了胞壁质外，还有其

他的一些成分，较多的是磷壁酸（teichoic acid），它是由甘油或核糖醇（ribitol）衍生物连接在一起形成的长的、负电性的聚合体。这种分子常常与胞壁质骨架共价结合在一起，其功能是稳定质膜和调节某些酶的活性。

4.1.3.2 革兰氏阴性菌的细胞壁

革兰氏阴性菌与革兰氏阳性菌在外被上有两个主要差别：第一，革兰氏阴性菌的胞壁质比较薄，并且扩展交联程度较低，这样革兰氏阴性菌细胞壁的硬度较差，并且使得这两类菌在染色反应上有所不同，由于革兰氏阴性菌胞壁酸含量少，染色后很容易被乙醇除去。第二，革兰氏阴性菌具有双层细胞膜，一层位于胞壁质的外侧。外膜在化学组成上比较特别，它的内脂层是典型的磷脂层，但是外脂层几乎都是脂多糖，使得外膜的渗透性很高。外膜中除了脂和脂多糖外，还有很多蛋白质，有些是受体，有些是运输蛋白，有些则是特殊结构的锚定位点，这些外膜蛋白的存在扩展了细胞壁的功能。图 4-13 所示是大肠杆菌的细胞壁结构。

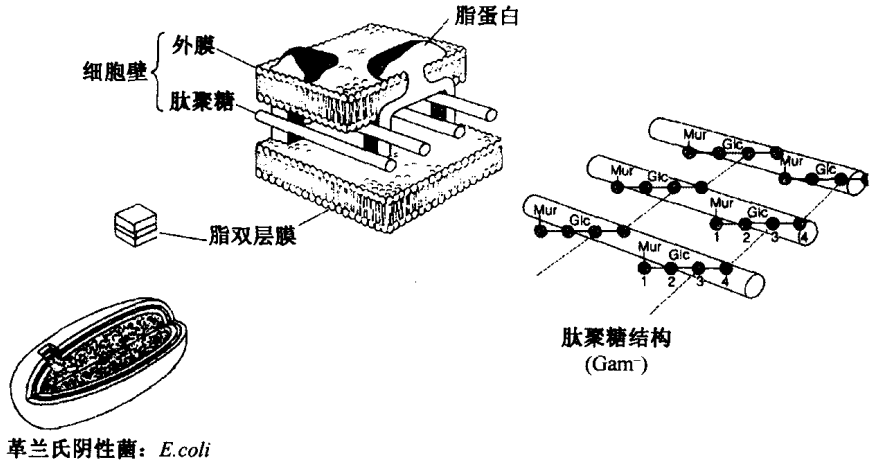


图 4-13 *E.coli* 的细胞壁结构示意图（引自 Becker *et al.*，1996）
在外膜的内侧，有一层或几层肽聚糖构成的细胞壁。两层膜之间具有周质间隙蛋白，起物质运输作用。

4.1.3.3 细菌细胞壁的合成及青霉素的抑制作用

细菌细胞壁的合成与装配是相当复杂的过程。细菌细胞壁的生长是将新的肽聚糖添加到原有的肽聚糖的内侧，该过程需要许多酶的参与，其中大多数都定位于质膜上。所有参与合成的酶都是原核生物特有的。根据这一点，人们可以使用特殊的药物处理细菌的细胞，阻止细菌细胞壁的合成，从而达到临床治疗的作用，其中最典型的例子是青霉素的使用。青霉素是由真菌产生的一种抗生素，它能够抑制参与细菌细胞壁肽聚糖装配后形成肽侧链的酶的活性，没有了侧链，细菌细胞就不能够抵抗正常的渗透压，其结果被处理的细菌细胞就会破裂。青霉素主要是对革兰氏阳性菌起作用，因为革兰氏阴性菌的细胞壁中肽聚糖含量较少，所以对青霉素不太敏感。

4.1.3.4 细菌的荚膜

荚膜（capsule）是细菌（包括革兰氏阳性和革兰氏阴性菌）在适当的环境条件下形成的

细胞最外面的保护层（图 4-11），主要成分是多糖，也有少量的多肽。荚膜不是细菌的必需结构，但是它的形成能够更好地保护细菌，同时也提高了细菌的感染力，这对于人类和动物都是不利的。

4.2 细胞外基质

动物是由多种类型的细胞组成的有机体，而且不同类型的细胞通常要组成固定的组织，不过，有些细胞是流动的，如血细胞悬浮在液体中，并要流通全身。在多数组织中，细胞要向细胞外分泌一群大分子，这些大分子在细胞间交织连接形成网状结构，将这种结构称为细胞外基质（extracellular matrix，ECM）。

4.2.1 细胞外基质的基本组成和功能

细胞外基质是由细胞合成并分泌到胞外、分布在细胞表面或细胞之间的大分子，主要是一些多糖和蛋白，或蛋白聚糖。细胞外基质对于一些动物组织的细胞具有重要作用。

4.2.1.1 细胞外基质的组成

细胞外基质的组成可分为 3 大类：①蛋白聚糖（proteoglycan），是由糖胺聚糖（glycosaminoglycan）以共价的形式与线性多肽连接而成的多糖和蛋白复合物，它们能够形成水性的胶状物；②结构蛋白，如胶原和弹性蛋白，它们赋予细胞外基质一定的强度和韧性；③黏着蛋白（adhesive protein），如纤连蛋白和层黏连蛋白，它们促使细胞同基质结合。其中以胶原和蛋白聚糖为基本骨架在细胞表面形成纤维网状复合物，这种复合物通过纤连蛋白或层黏连蛋白以及其他的连接分子直接与细胞表面受体连接；或附着到受体上。由于受体多数是膜整合蛋白，并与细胞内的骨架蛋白相连，所以细胞外基质通过膜整合蛋白将细胞外与细胞内连成了一个整体（图 4-14）。

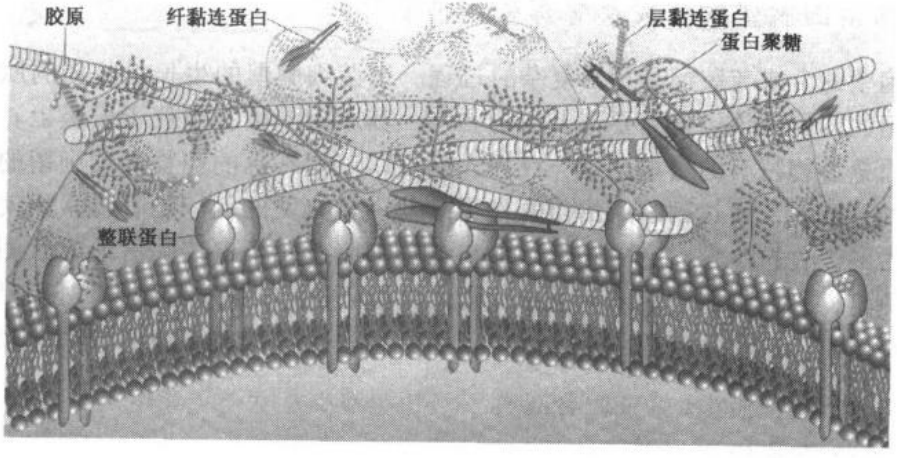


图 4-14 细胞外基质的组成和可能的结构（引自 Karp，2002）

动物细胞的细胞外基质的主要成分是胶原，而植物细胞壁的主要成分是纤维素。虽然动物细胞外基质与植物的细胞壁在结构和组成上有很大的不同，但是有共同的特征：它们都含有长长的坚硬的纤维，并且这些纤维都是包埋在两性的基质中，在基质中充满了糖蛋白或多糖（表 4-1）。

表 4-1　动物细胞的细胞外基质与植物细胞壁的主要组成

细胞类型	细胞外结构	结构纤维	水合基质成分	黏着分子
动物细胞	细胞外基质	胶原、弹性蛋白	蛋白聚糖	纤连蛋白、层黏连蛋白
植物细胞	细胞壁	纤维素	半纤维素、果胶和伸展蛋白	—

能够分泌和形成细胞外基质的主要细胞类群是成纤维细胞（fibroblast）和少数其他特化组织的细胞。

各种不同组织的细胞分泌形成的细胞外基质在特性上有显著的差异，例如骨细胞的细胞外基质比较硬，而软骨组织几乎都是由细胞外基质组成的，所以弹性很强。但是围绕腺体和血管的结缔组织的细胞外基质胶性很强，在细胞外基质中含有许多分散的细胞（图 4-15）。

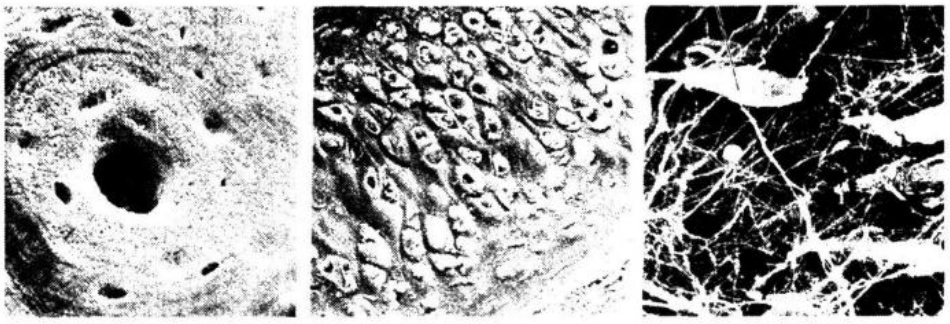


图 4-15　骨细胞、软骨组织和结缔组织细胞外基质的扫描电镜照片（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）
左：骨细胞；中：软骨组织；右：结缔组织。

4.2.1.2　细胞外基质的功能

细胞外基质是由惰性材料组成的细胞外结构，它对细胞的形态和活性具有重要作用。例如，若用酶将培养的软骨细胞或哺乳动物的胰腺表皮细胞的 ECM 水解掉，细胞的合成和分泌活动就会显著下降；此时将细胞外基质材料再添加到处理的培养瓶，可使细胞恢复活力并分泌产物。

另外，细胞外基质能够帮助某些细胞完成特有的功能。如肝细胞（hepatocyte），作为肝组织的主要细胞必须同基膜或其他的细胞外基质接触才能合成细胞型（cell-type）的蛋白质。将肝细胞分离并放在塑料培养皿中培养，即使加有某种胶原纤维，它们也会停止翻译肝组织特异蛋白（如白蛋白）的 mRNA，并停止合成这些 mRNA。如果在培养细胞的培养液中添加了合适的细胞外基质的成分，mRNA 的合成和翻译就会恢复。

细胞外基质除了决定器官和组织的形态及保护作用外，还具有其他一些重要功能，如同一些生长因子和激素结合进行信号转导；某些特殊的细胞外基质也是细胞分化所必需的。胚胎发育的最后阶段——形态发生（morphogenesis）也需要某些细胞外基质的成分。

4.2.2 蛋白聚糖与透明质酸

细胞外基质的物理性质主要受细胞外基质中蛋白聚糖（proteoglycan，PG）所携带的多糖基团的影响，蛋白聚糖是由糖胺聚糖（glycosaminoglycan，GAG）以共价的形式与线性多肽连接而成的多糖和蛋白质复合物。

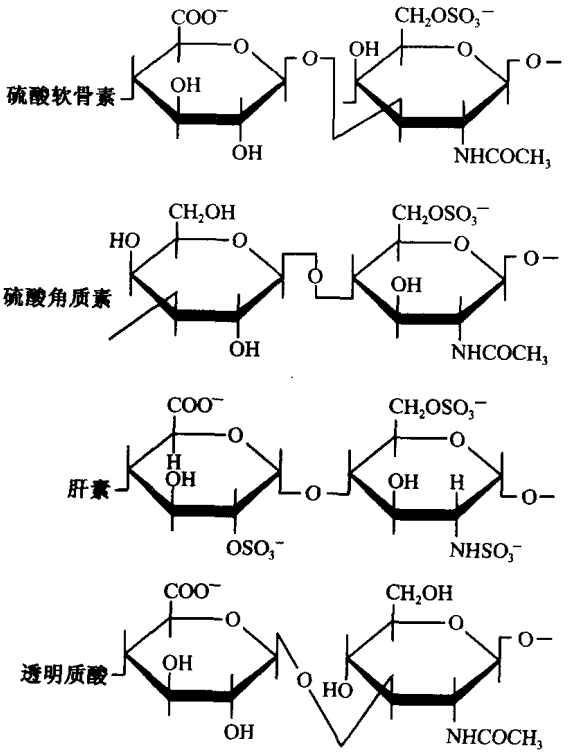


图 4-16 糖胺聚糖中常见的重复二糖单位

4.2.2.1 蛋白聚糖的结构

糖胺聚糖

蛋白聚糖的主要成分是糖胺聚糖，是由重复二糖单位构成的无分支长链多糖（图 4-16）。

构成糖胺聚糖的二糖单位包括：硫酸软骨素（chondroitin sulfate）、硫酸角质素（keratan sulfate）、肝素（heparin）、硫酸乙酰肝素（heparan sulfate）、透明质酸（hyaluronic acid）、硫酸皮肤素（dermatan sulfate）等。这些二糖都含有一个氨基糖，并至少含有一个负电的磺酸基或羧基团。由于氨基聚糖是亲水的，并且带有负电荷，所以它们既能结合阳离子又能结合水分子，由于糖胺聚糖的这种性质，它们在细胞外创造了水合的、胶状的材料，形成了所谓的细胞外基质的基质（ground substance）。

蛋白聚糖

大多数糖胺聚糖都是同蛋白质共价结合形成糖和蛋白质的复合物，称为蛋白聚糖（图 4-17）。

每个蛋白聚糖含有多个糖胺聚糖，其多糖的含量占蛋白聚糖质量的 95%。蛋白聚糖又称黏蛋白，是由糖胺聚糖与核心蛋白（core protein）的丝氨酸残基共价连接形成的巨型分子，由于核心蛋白和糖胺聚糖的不同，因而可形成不同的蛋白聚糖。

透明质酸

细胞外基质中发现的大多数糖胺聚糖都作为蛋白聚糖的一个成分而存在，惟一例外的是透明质酸。它既能参与蛋白聚糖的形成，又能游离存在。在软骨组织的细胞外基质中，透明质酸同糖胺聚糖和核心蛋白组成软骨组织的蛋白聚糖复合物，称为透明质酸-蛋白聚糖复合物。在这种复合物中，透明质酸作为一个长轴，将蛋白聚糖连接在一起，形成更大的更复杂

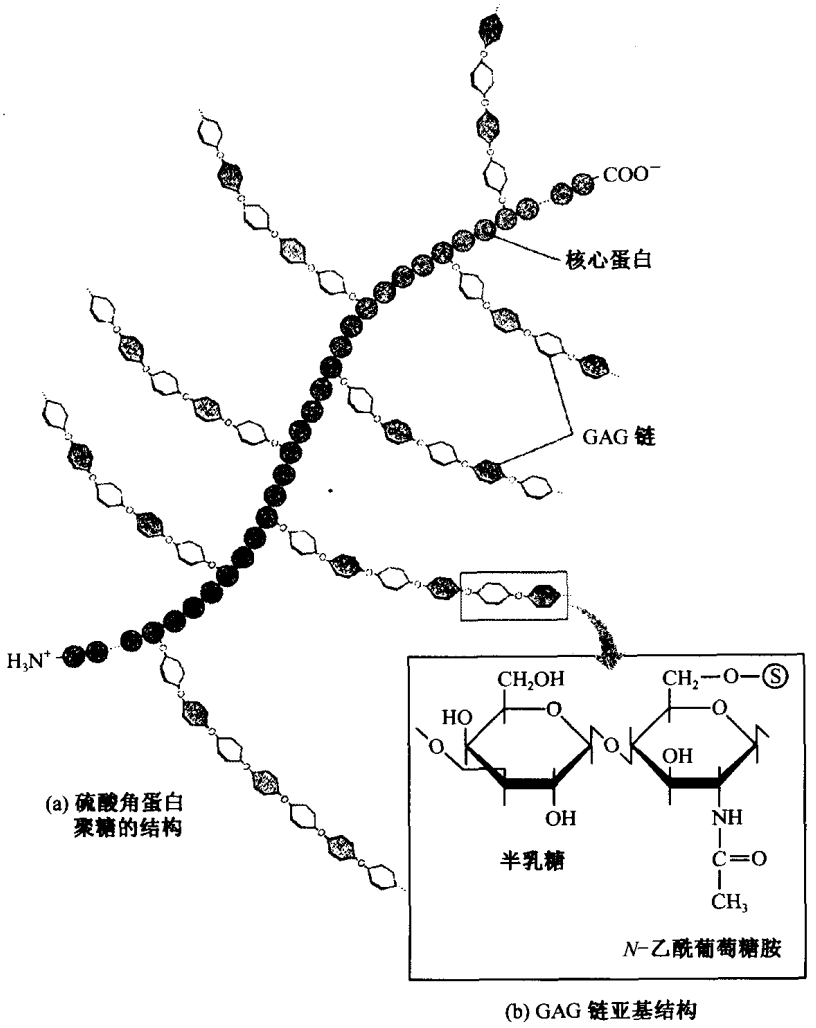


图 4-17　蛋白聚糖的结构（引自 Becker *et al*., 1996）

(a) 糖胺聚糖（GAG）和核心蛋白构成的蛋白聚糖；(b) 糖胺聚糖中的二糖单位。

的蛋白聚糖（图 4-18），使细胞外基质具有更大的抗压性。透明质酸是一种重要的糖胺聚糖，是增殖细胞和迁移细胞的细胞外基质的主要成分，一旦迁移细胞停止移动，透明质酸就会从细胞外基质中消失，此时细胞间开始接触。

4.2.2.2　蛋白聚糖的功能

蛋白聚糖或透明质酸-蛋白聚糖复合物构成了细胞外基质的基质，由于它们是高度酸性的，且带负电荷，因此能够结合大量的阳离子，这些阳离子又可结合大量的水分子，这样，蛋白聚糖形成了多孔的、吸水的胶状物，如同包装材料，填充在细胞外基质中。蛋白聚糖的这种性质，使细胞表面具有较大的可塑性，从而具有抗挤压能力，对细胞起保护作用。

由于透明质酸以可溶的形式游离存在，所以在细胞外体液和滑液（synovial fluid）中透明质酸的浓度很高，其结果提高了体液和滑液的黏度和润滑性。

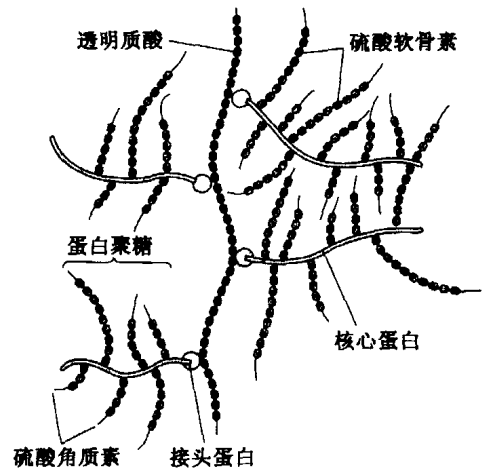


图 4-18　透明质酸在软骨组织细胞外基质的蛋白聚糖中的作用（引自 Kleinsmith *et al.*，1995）

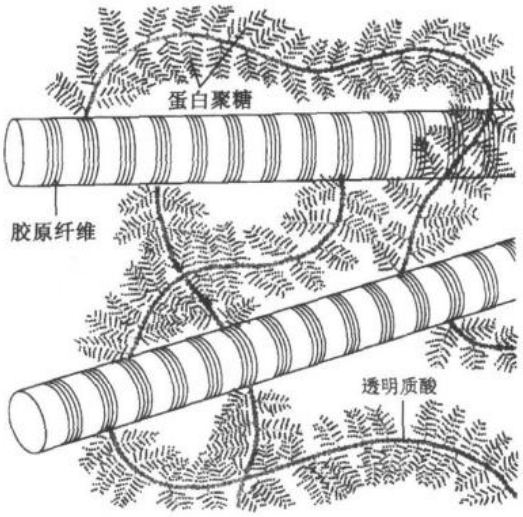


图 4-19　透明质酸-蛋白聚糖与胶原纤维连接在细胞外基质中形成纤维网络（引自 Wolfe，1993）

单个的蛋白聚糖或透明质酸-蛋白聚糖复合物直接与胶原纤维连接形成动物细胞外的纤维网络（fibernetwork）结构（图 4-19），不同类型的胶原和不同类型的蛋白聚糖连接形成不同的纤维网络，对于提高细胞外基质的连贯性起关键作用。

此外，蛋白聚糖还可作为细胞黏着的暂时性或永久性的位点。暂时性的黏着发生在胚胎发育中，对于单个细胞及细胞层的移动具有重要作用。另外，蛋白聚糖对于细胞分化也十分重要，同时也与细胞癌变有关。

不同组织的细胞外基质中蛋白聚糖的分布不同，分子质量也不尽相同（表 4-2）。

表 4-2　蛋白聚糖及分布

类型	核心蛋白分子质量	分布
硫酸软骨素	200 000～300 000（在软骨中）	软骨、骨、皮肤、基膜中少量
	45 000（在骨中）	
	45 000 和 500 000（在皮肤中）	
硫酸角质素	45 000	骨、角膜
硫酸皮肤素	40 000～50 000	腱、原纤维结缔组织、皮肤和角膜中少量
硫酸乙酰肝素	30 000～200 000	基膜、角膜、神经组织
透明质酸-蛋白聚糖复合物	十万到百万	软骨、骨（少量）、腱、主动脉平滑肌

4.2.3　胶原和弹性蛋白

胶原（collagen）　是细胞外最重要的水不溶性纤维蛋白，是构成细胞外基质的骨架，在

细胞外基质中形成半晶体的纤维，给细胞提供抗张力和弹性，并在细胞的迁移和发育中起作用。胶原在各种动物中都有存在。脊椎动物中腱、软骨和骨中的胶原非常丰富，几乎占了蛋白总重的一半。

4.2.3.1 胶原的结构和种类

胶原蛋白的基本结构单位是原胶原（tropocollagen），原胶原肽链的一级结构具有（Gly-Pro-X)$_n$ 重复单位，其中 X 可以是任何一种氨基酸，但常为羟赖氨酸（Hylys）。Hylys 残基可发生糖基化修饰，其糖单位有的是一个半乳糖残基（Gal），但通常是二糖（Glu-Gal-），胶原上的糖所占的量约为胶原的 10%。原胶原是由三条 α 肽链组成的纤维状蛋白质，相互拧成三股螺旋状构型，长 300nm，直径 1.5nm（图 4-20）。

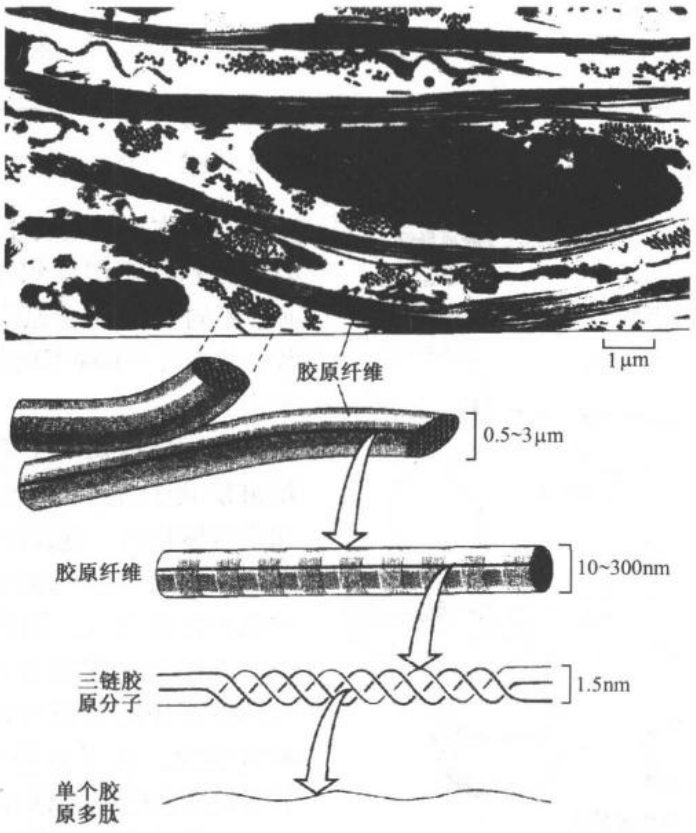


图 4-20 胶原的组织和结构（引自 Alberts *et al*., 1994）
电镜照片所示的是鸡胚胎结缔组织的胶原纤维；图解是胶原的分子结构。

不同类型的胶原，分别称为 I 型、II 型……不同类型的胶原有不同的化学结构和不同的免疫性能，是不同基因的表达产物。各类胶原都有两个共同的特点：①都是由 3 条肽链组成；②各类胶原蛋白的氨基酸组成完全不同，这在其他蛋白质中从未发现过。表 4-3 是已鉴定的部分胶原纤维的结构特征和分布。

表 4-3　胶原的类型、结构和分布

类型	亚单位	结构	分布
I	α1 (I), α2 (I)	纤维状	皮肤、腱、骨等
II	α1 (II)	纤维状	软骨、玻璃体液
III	α1 (III)	纤维状	皮肤、肌肉等
IV	α1 (IV), α2 (IV)	非纤维状	所有的基膜
V	α1 (V), α2 (V), α3 (V)	纤维状	大多数间隙组织
VI	α1 (VI), α2 (VI), α3 (VI)	纤维状	大多数间隙组织
VII	α1 (VII)	非纤维状	锚定原纤维
VIII	α1 (VIII)	?	某些内皮细胞
IX	α1 (IX), α2 (IX), α2 (IX)	?	软骨
X	α1 (X)	?	肥大和盐质软骨
XI	α1 (XI), α2 (XI), α3 (XI)	纤维状	软骨
XII	α1 (XII)	?	皮肤、腱
XIII	α1 (XIII)	?	表皮、基膜
XIV	α1 (XIV)	?	胎儿皮肤和腱

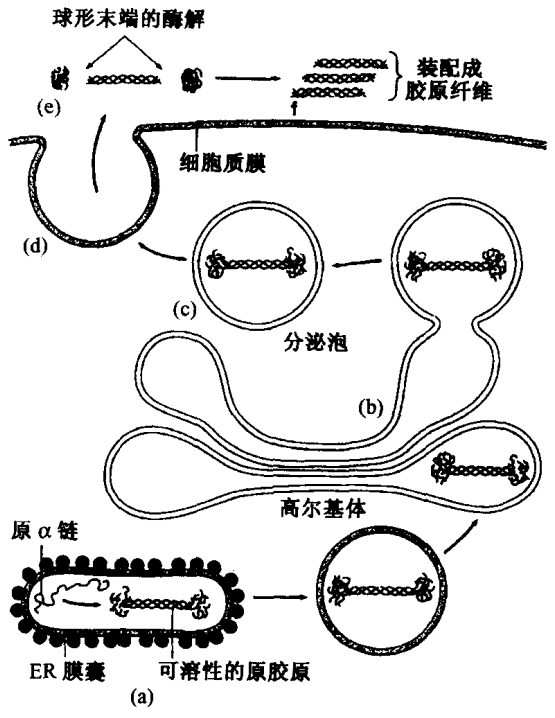


图 4-21　脊椎动物中 I、II、III 型胶原的合成、装配与分泌（引自 Wolfe, 1993）

(a)胶原的原α链在糙面内质网的核糖体上合成，并进入到ER池，此时的原α链的两端含有额外的氨基酸序列，然后3条原α链形成水溶性的三螺旋的原胶原；(b)新装配的原胶原进入高尔基体，然后被包装到分泌小泡中，进行分泌；(c)小泡与质膜融合，原胶原被释放到细胞外，由酶切去两端额外的氨基酸序列；(d)被加工后的胶原分子是高度不溶于水的，最后装配成胶原纤维。

4.2.3.2　脊椎动物胶原的合成与装配

目前在哺乳动物中发现了 20 个左右的基因分别在不同组织中编码不同类型的胶原；不同类型的胶原定位于体内的特定组织，也有 2～3 种不同的胶原存在于同一组织中。

胶原是由几千个不同的分子组成的高度组织化的结构，合成和装配十分复杂。如果将纯化的 α 链放在实验管中进行简单的混合既不会形成三链螺旋结构，更不会有成熟的胶原生成。因此，推测细胞必定有某种机制进行胶原的合成和自我装配，形成高度有序的胶原纤维。为研究胶原的合成和装配，利用体外培养的成纤维细胞，并用放射性的氨基酸标记新合成的蛋白质，获得了有关胶原合成的某些信息。

胶原蛋白是在膜结合核糖体上起始合成的，然后进入内质网，通过内质网和高尔基体的加工修饰和装配，最后分泌到细胞外基质中（图 4-21）。

首先在糙面内质网的核糖体上合成仅含有信号肽的原 α 链（pro-α-chain），又称前原胶原（preprocollagen），原 α 链进入内质

网，然后在内质网腔中通过分子内交联，三股前体肽自我装配形成三股螺旋，即前胶原（procollagen）。前胶原进入高尔基体，经过加工修饰，并在高尔基体反面网络被包进分泌小泡，然后通过与质膜的融合，分泌到细胞外。在细胞外，前胶原被两种专一性不同的蛋白水解酶作用，切除N端和C端的前肽，两端各保留部分非螺旋区，称为端肽区（telopeptide region），此时形成的是胶原（collagen）。胶原通过分子间交联进而聚合成胶原原纤维（collagen fibrill），最后装配成胶原纤维（collagen fiber）。前胶原是可溶性的，聚合成胶原纤维就成为水不溶的了。

装配过程中涉及的原α链、前胶原、胶原、胶原原纤维及胶原纤维的关系示于图4-22。

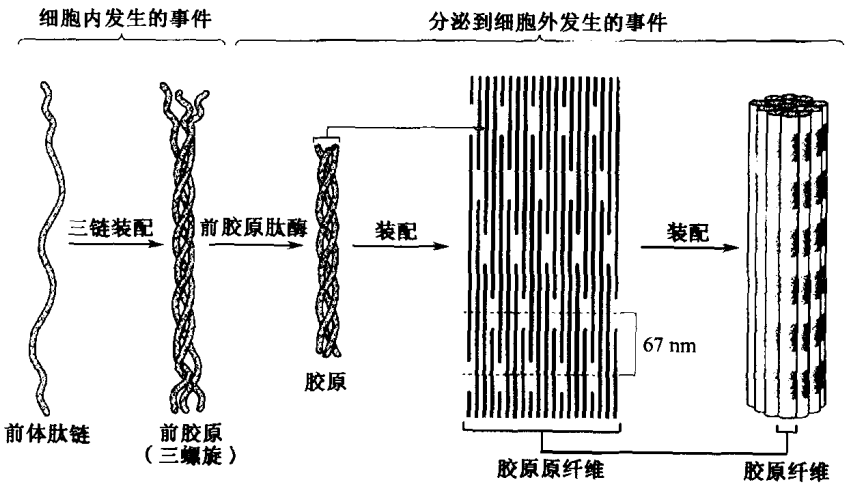


图4-22　胶原装配的主要步骤（引自 Kleinsmith *et al.*，1995）

由前体肽装配成前胶原时，是通过分子内的交联完成的。而由胶原装配成胶原原纤维则是通过分子间的交联。分子内交联是指前胶原的3条链之间的赖氨酸残基间的交联，分子间的交联是指不同前胶原间的赖氨酸交联。分子间的交联使得在胶原纤维内部形成胶原蛋白分子呈1/4平行交替排列，即一个前胶原的头部与下一个原胶原的尾部有一个小的间隙分隔。平行排列的分子通过前胶原分子N端与相邻原胶原分子C端的赖氨酸或羟赖氨酸间形成共价键加以稳定（图4-23）。

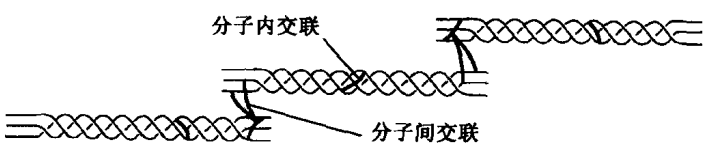


图4-23　胶原纤维的分子间和分子内交联

交联作用涉及多步反应：首先是某些赖氨酸和羟赖氨酸残基在赖氨酰氧化酶的作用下脱氨基，形成高活性的醛基，然后醛基可自动发生反应，在这两个氨基酸之间形成共价键（图4-24）。

在胶原装配过程中还涉及复杂的加工修饰作用。新生肽进入内质网后首先被信号肽酶切除

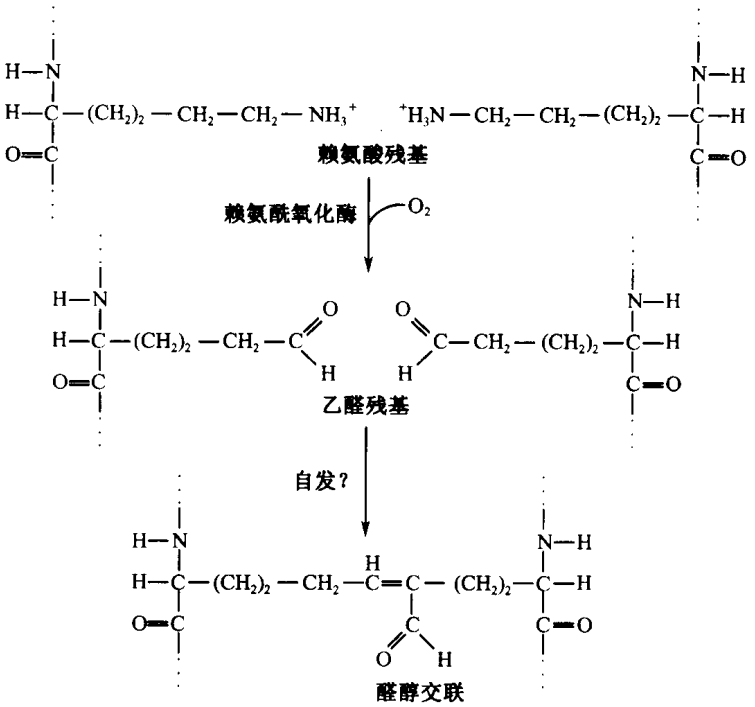


图 4-24　胶原分子间的交联

信号肽，然后将某些脯氨酸和赖氨酸进行羟基化，并将半乳糖添加到羟脯氨酸上(图4-25)。

4.2.3.3　胶原的功能

胶原纤维有许多重要的功能，首先它为细胞外基质提供了一个水不溶性的框架，决定细胞外基质的机械性质。某一特定组织的性能通常与胶原分子的三维结构有关。例如腱，它起着连接肌肉和骨的作用，因此在肌肉收缩时必须能够承受巨大的拉力。腱具有细胞外基质，并且在 ECM 中胶原纤维沿着腱的长轴平行排列，因此与拉力的方向平行。又如角膜是一个特别的组织，它既要坚硬以便对眼球提供保护，但又必须是透明的以便光通过到达视网膜。角膜的厚厚中间层就是细胞外基质，其中含有相当短的胶原纤维，并组成不同的层。角膜基质的层次结构与胶合板相似，同一层中纤维是相互平行的，但与另一层的纤维却是垂直的(图 4-26)，这种组织方式既赋予了这种娇嫩组织的强度，又提高了组织的透明度。

如果编码胶原的基因发生突变，将导致胶原病。若影响到胶原纤维的正确装配，皮肤和其他各种结缔组织就会因此降低强度而变得非常的松弛（图 4-27)。

胶原是骨、腱和皮肤组织中的主要蛋白，这些组织的细胞外基质不仅胶原含量高，而且刚性及抗张力大，构成了细胞外基质的附加结构。细胞外基质中的其他组分通过与胶原的结合，形成结构与功能的复合体。

另外，胶原具有促进细胞生长的作用，如肝细胞等在含有胶原的培养基上生长较快。在细胞分化中，胶原基质和提纯的胶原底物具有维持并诱导细胞分化的作用。许多实验证明，某种细胞经过特异的黏连蛋白的介导，可以黏连到特定类型胶原上。许多上皮细胞和内皮细胞经层黏连蛋白的介导可与基膜中的 IV 型胶原黏连。

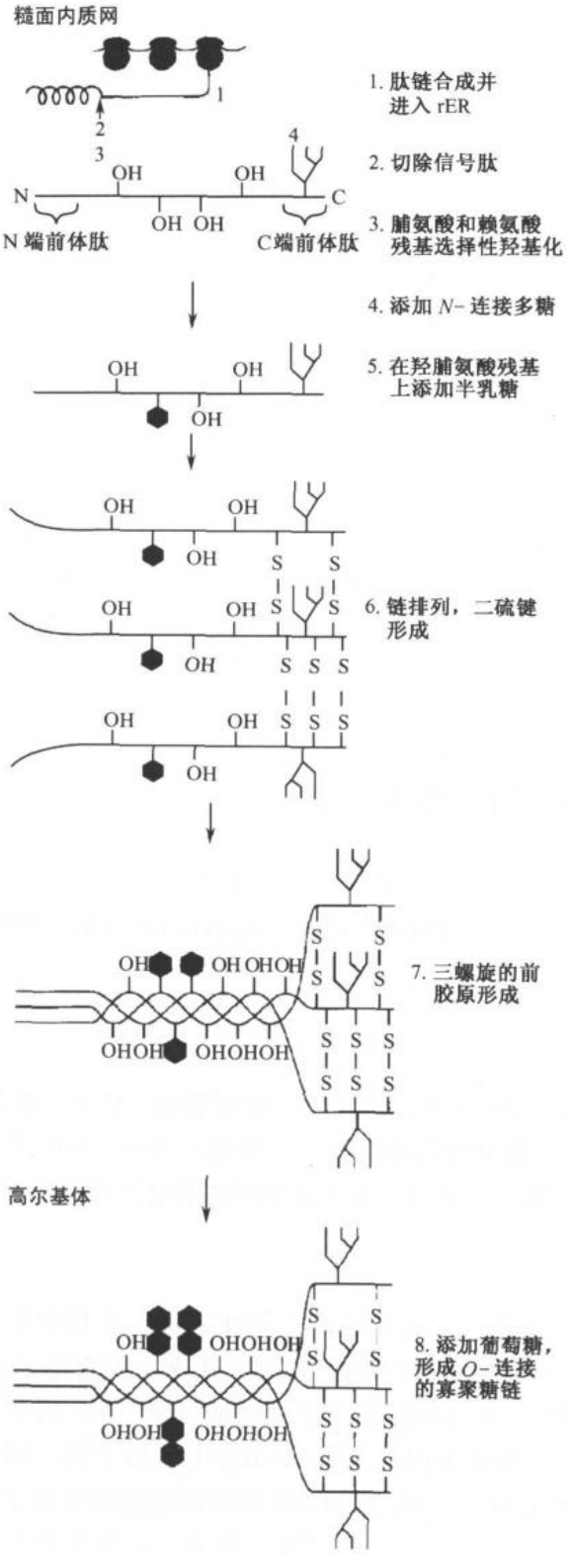


图 4-25　胶原分子在糙面内质网和高尔基体中的修饰
（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

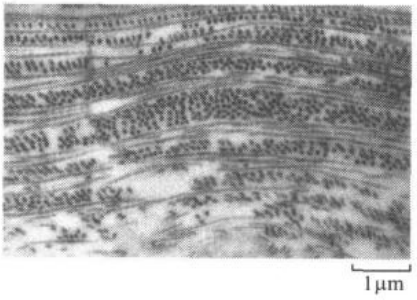


图 4-26　角膜基质的结构
（引自 Karp, 1996）

图 4-27　皮肤过度松弛症
（引自 Alberts *et al*., 1998）

这是 1890 年拍摄的“弹性皮肤人”的照片。“皮肤过度松弛症”是由于胶原装配不正确引起的遗传综合征。在某些个体中，由于胶原酶缺陷而引起，因为胶原酶缺陷，不能将前胶原转变成胶原。

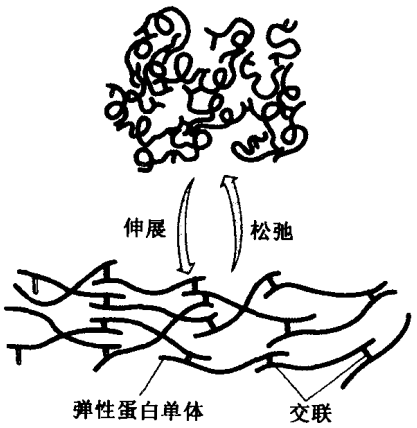


图 4-28 弹性纤维曲伸模型
（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）
交联网络中的每一个弹性蛋白分子都能以伸展或压缩两种构型存在，因此导致弹性纤维的紧缩和伸展。

4.2.3.4 弹性蛋白

弹性蛋白（elastin）是弹性纤维（elastic fiber）的主要成分。弹性纤维主要存在于韧带和脉管壁。弹性纤维与胶原纤维共同存在，赋予组织以弹性和抗张能力。

虽然胶原能够给细胞外基质以强度和韧性，但是对于某些组织来说还需要富有弹性。特别是肺、心脏等组织尤其是这样。这种弹性主要依赖于细胞外基质中的弹性纤维。弹性纤维如同橡皮带一样，它的长度能够伸展到正常长度的几倍，当收缩时又能恢复到原始长度。组织的弹性则是通过改变散布在弹性纤维中胶原的数量来控制。

像胶原一样，弹性蛋白也富含甘氨酸和脯氨酸，但是与胶原不同的是，弹性蛋白的羟基化程度不高，没有羟赖氨酸的存在。弹性蛋白分子间通过赖氨酸残基形成共价键进行相互交联，它们形成的交联网络可通过构型的变化产生弹性（图 4-28）。

4.2.4 细胞外基质中的黏着蛋白

细胞外基质中的第三类成分是黏着蛋白，之所以将这些蛋白称为黏着蛋白，是因为这些蛋白起着将细胞外基质与细胞联系起来的桥梁作用。细胞外基质中的黏着蛋白包括纤连蛋白、层黏连蛋白等。

4.2.4.1 纤连蛋白

纤连蛋白（fibronectin，FN）属非胶原糖蛋白的一种，称为冷不溶球蛋白，它是一种黏附性的糖蛋白，广泛存在于动物界，包括海绵、海胆及哺乳动物类。在脊椎动物中，纤连蛋白以可溶的形式存在于血浆和各种体液中，称为血浆纤连蛋白。以不溶的纤维存在于细胞外基质、细胞之间及某些细胞表面，称为细胞纤连蛋白。

FN 的结构

FN 是高分子质量的糖蛋白，含糖约 5%。由两个亚基组成的二聚体，每个亚基的分子质量约 250kDa，各亚基在 C 端形成两个二硫键交联。血浆 FN 是二聚体，由两条相似的 A 链和 B 链组成，整个分子成 V 形。细胞 FN 是多聚体，其不同来源的 FN 亚基结构相似，但并不相同。不同的亚单位均为同一基因的表达产物，只是转录后在 RNA 的剪接上有所不同，因而产生不同的 mRNA。另外，在翻译后的修饰上也有差异，FN 的每个亚单位的蛋白组成若干个球形结构域，各结构域之间由对胰蛋白酶敏感的肽链连接，因此可通过胰蛋白酶的水解作用分离这些结构域研究它们的功能。每个 FN 亚基上有与胶原、细胞表面受体、血纤蛋白和硫酸蛋白多糖高亲和结合的位点（图 4-29）。

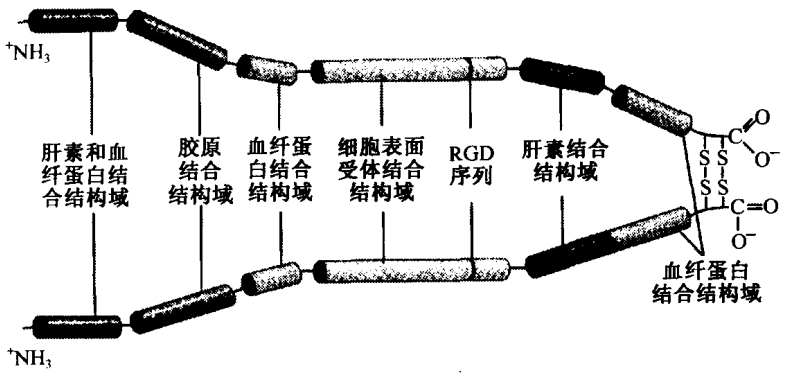


图 4-29　纤连蛋白的结构（引自 Becker *et al*., 1996）

用蛋白酶消化细胞结合区，可以发现这一结构域中 Arg-Gly-Asp 三肽序列负责同细胞表面的结合，Arg-Gly-Asp 序列简称 RGD 序列，同样存在于细胞外基质和血液的其他类型的黏着蛋白序列中。RGD 序列有时又称 RGDS，最后一个 S 代表丝氨酸，可能细胞表面受体整合素与 FN 识别和结合也与丝氨酸有关。

FN 的功能

FN 可与多种物质及细胞结合，执行多种功能。FN 最主要的功能是介导细胞的黏着。FN 可以同其在细胞膜上的受体结合，根据对受体的分析，发现受体的细胞外结构域有与 Arg-Gly-Asp-Ser 高亲和结合部位。由于 FN 具有同时与细胞外基质各类成分相结合的特点，并可促进细胞外基质的其他成分的沉积，有人认为 FN 是细胞外基质的组织者。

在 FN 的分子上既有与胶原结合的结构域，又有与细胞结合的结构域。这样，FN 可以介导细胞外基质与细胞进行结合。

FN 能够影响细胞的迁移。一个突出的例子是胚胎发生早期神经脊细胞的迁移。在神经管形成时，神经脊细胞从神经管的背侧迁移到胚胎各个区域，分化成神经节、色素细胞等不同类型的细胞。一般认为 FN 纤维为细胞的运动提供了轨道，这种推测也得到了实验的证明。将 FN 特异的抗体直接注射到正在发育的胚中，以此阻止细胞同 FN 的结合，这种处理影响了正常细胞的迁移，导致异常胚的发育。

FN 介导细胞的黏着和影响细胞的迁移对于细胞及肌体的生命活动有重要的意义。FN 引导免疫系统的细胞移向受伤部位，促使伤口愈合。另外，FN 同癌细胞扩散也有密切的关系。在正常组织里，细胞是由多种多样的糖蛋白黏连起来，并约束在一个固定的位置上，主要是靠 FN 来维持其稳定状态。在这种情况下，癌细胞如果要转移，就必须先将结合在细胞之间的 FN 切断，或把它们消化掉，癌细胞才能游离开来自由活动，并通过血液或淋巴系统漂移出去。

对劳氏肉瘤病毒的研究发现，癌基因合成一种蛋白来激活 FN 水解酶的活性，可切断 FN 形成的网络，这种水解酶是正常细胞本身合成的，但没有活性，只有被外来物质激活后才能起作用。

4.2.4.2　层黏连蛋白

细胞外基质中另一个重要的黏着糖蛋白就是层黏连蛋白（laminin，LN），是基膜的主要

结构成分。LN 也广泛分布于脊椎动物和一些无脊椎动物，如昆虫和海胆中。在某些动物胚胎的十六细胞期就出现了 LN。

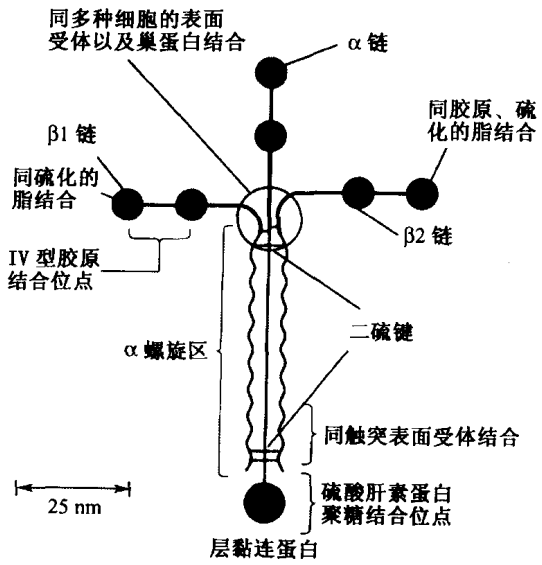


图 4-30　层黏连蛋白的结构
（引自 Lodish *et al*., 1995）

LN 的基本结构

LN 是基膜所特有的非胶原糖蛋白，分子质量为 820kDa，含 13%～15% 的糖，有 3 个亚单位，即重链（α 链，400kDa）和 β1（215kDa）、β2（205kDa）两条轻链。结构上呈现不对称的十字形，由一条长臂和 3 条相似的短臂构成。这 4 个臂均有棒状节段和球状的末端域。β1 和 β2 短臂上有两个球形域，α 链上的短臂有 3 个球形结构域，其中有一个结构域同 IV 型胶原结合，第二个结构域同肝素结合，还有同细胞表面受体结合的结构域（图 4-30）。正是这些独立的结合位点使 LN 作为一个桥梁分子，介导细胞同基膜结合。

LN 的功能

在基膜中，由于 LN 具有与 IV 型胶原、细胞表面及其他的蛋白聚糖结合的位点，所以 LN 的主要功能就是作为基膜的主要结构成分对基膜的组装起关键作用，在细胞表面形成网络结构并将细胞固定在基膜上。

LN 还有许多其他的作用，如在细胞发育过程中刺激细胞黏着、细胞运动。LN 还能够刺激胚胎中神经轴的生长，并促进成年动物的神经损伤后重生长和再生。如同纤连蛋白，细胞外的 LN 能够影响细胞的生长、迁移和分化。

4.2.5　细胞外基质与细胞的相互关系

细胞外基质是细胞分泌到细胞外的大分子物质，这些大分子物质之间的关系如何？它们反过来对细胞的生命活动有什么影响？

4.2.5.1　基膜

基膜（basal lamina，basement membrane）是一种复合的细胞外结构，通常位于上皮和内皮的基底面，是细胞外基质的特异区。典型的基膜厚约 50nm，有些基膜的厚度达 200nm。

通常会形成基膜的组织和细胞有：①肌细胞和脂肪细胞的表面；②上皮组织基底面的下方，如皮肤上皮的下表面，将上皮细胞与结缔组织分开（图 4-31）；③血管内皮细胞的下表面。此外，在施旺细胞（Schwann cell）的表面也覆盖有基膜。

基膜是由不同的蛋白纤维组成的网状结构，主要成分有 LN、IV 型胶原、巢蛋白（entactin）、肌腱蛋白（tenascin）、钙结合糖蛋白（thrombospondin）、硫酸肝素糖蛋白等。LN

在基膜的形成中起重要作用，因为 LN 具有许多不同的结构域，其中具有与其他蛋白复合物结合的特殊位点。此外，LN 能够同细胞表面受体结合，也能够同其他的 LN 分子以及同其他的糖蛋白，包括基膜中其他的一些成分结合。更重要的是，LN 同 IV 型胶原结合，形成分隔的交联网状结构，形成的基膜通过 LN 与细胞表面受体紧密结合，将基膜与覆盖的细胞紧密结合起来（图 4-32）。由此看来，LN 不仅是基膜的主要成分，也是基膜的组织者，而 IV 型胶原则是基膜的网状钢架。

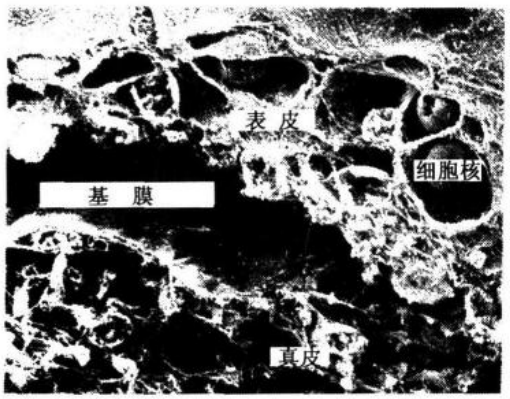


图 4-31　人皮肤的扫描电镜照片显示基膜将表皮细胞与底层细胞分开（引自 Karp，1996）

基膜不仅对组织结构起支持作用，同时也是渗透性的障碍，调节分子和细胞的运动。在肾细胞中，基膜可以作为一种过滤器，允许小分子进入尿液，扣下大分子的蛋白质。表皮细胞下的基膜一方面阻止结缔组织的细胞进入表皮，另一方面允许“防卫战士”——白细胞的移动。

基膜对于细胞的迁移也有影响，研究发现基膜能够阻止某些游动癌细胞的入侵，这一点特别引起人们的兴趣。

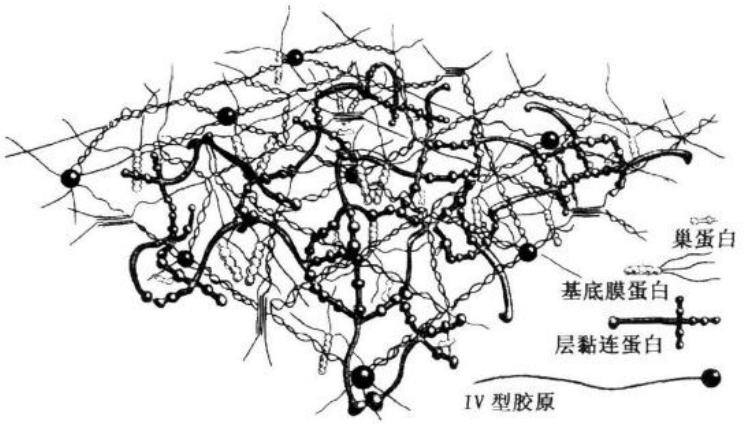


图 4-32　基膜的分子结构模型（引自 Alberts *et al*.，1994）

4.2.5.2　整联蛋白

整联蛋白（integrin）属整合蛋白家族，是细胞外基质受体蛋白，与其他的激素或信号分子受体不同的是：整联蛋白与配体的结合力较低，但浓度却比其他的受体高 10～100 倍。

整联蛋白的结构与功能

整联蛋白是一种跨膜的异质二聚体，它由两个非共价结合的跨膜亚基，即 α 和 β 亚基所组成。每个亚基的细胞外，露出脂双层部分是球形的头，露出脂双分子层约 20nm。整联蛋白的 α 和 β 链都是糖基化的，并通过非共价键结合在一起（图 4-33）。

两个亚基的细胞外部分都能同基质蛋白结合。有的整联蛋白只能同一种基质蛋白结合，

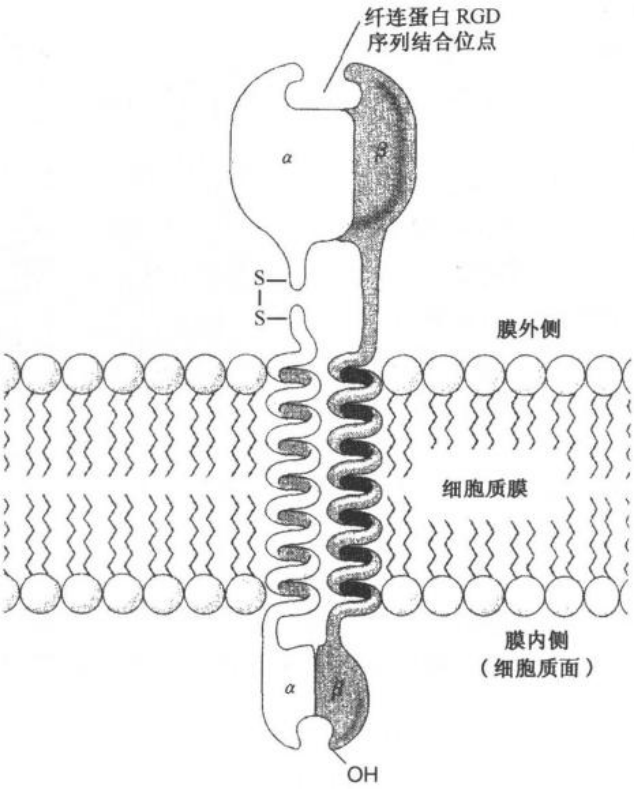


图 4-33　整联蛋白的结构（引自 Becker *et al*., 2000）

有的则可同多种细胞外基质蛋白结合。不同类型的整联蛋白识别不同的序列。整联蛋白的细胞内的尾部则同肌动蛋白相连。

整联蛋白同基质蛋白的结合需要二价阳离子，如 Ca^{2+}、Mg^{2+} 等的参与。有些细胞外基质蛋白可被多种整联蛋白识别。

第一个被分离和鉴定的整联蛋白是纤连蛋白受体（fibronectin receptor）。分离是通过亲和层析进行的，因为纤连蛋白同细胞结合的结构域有特殊的三氨基酸序列，这样就很容易将这种受体蛋白分离出来。纤连蛋白受体有 3 个结构域（其中一个是跨膜区），也是一种钙依赖性蛋白。该受体蛋白是一个二聚体，其 α 亚基是一条完整的 140kDa 的多肽链，由大小两部分组成，小的是跨膜部分，大的是细胞外部分，两者之间通过二硫键相连。膜外部分折叠成二价阳离子结合区。β 亚基的细胞外部分含有一个半胱氨酸富集重复区，各重复部分靠内部二硫键相连，β 链的分子质量为 100kDa。受体的头部能够通过对 RGD 序列的识别与 FN 结合。受体的细胞内结构域有踝蛋白（talin）结合位点，踝蛋白结合后，再通过黏着斑蛋白与细胞内的骨架成分——肌动蛋白结合（图 4-34）。

由上可知，整联蛋白除了将细胞外基质与细胞连接之外，还将细胞外基质同细胞内的骨架网络连成一个整体，整联蛋白本身作为跨膜接头在细胞外基质和细胞内肌动蛋白骨架之间起双向联络作用，这就是整联蛋白所起的细胞黏着作用。此外，整联蛋白还具有将细胞外信号向细胞内传递的作用，将在第 5 章介绍。

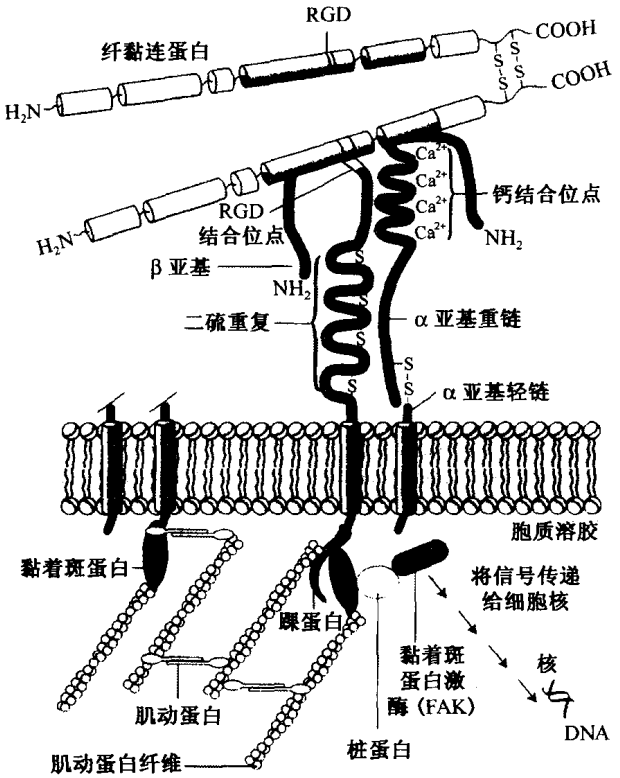


图 4-34　整联蛋白的功能（引自 Karp, 1999）

整联蛋白的β亚基含有 RGD 序列的结合位点，能够识别纤连蛋白及其他的细胞外基质物质。Ca^{2+}是整联蛋白结合活性所必需的，α亚基上具有 4 个 Ca^{2+}结合位点。两个亚基都是以α螺旋穿过质膜。整联蛋白的两个亚基的细胞质端常常同细胞骨架的肌动蛋白相连。整联蛋白和肌动蛋白之间要通过其他一些蛋白的介导才能连接起来，这些蛋白包括黏着斑蛋白（vinculin）和踝蛋白。整联蛋白的细胞质结构域也同蛋白激酶相互作用，如黏着斑激酶（focal adhesion kinase, FAK），整联蛋白与细胞外配体（如纤连蛋白、层黏连蛋白）的结合，能够激活这些蛋白激酶的活性，并开始信号转导的级联反应。

整联蛋白受体的类型

目前已经鉴定的整联蛋白约有 20 种，但只鉴定到 17 种不同的α亚基和 8 种β亚基。由于整联蛋白是异质二聚体，从理论上推测应该有 100 种以上的α亚基和β亚基配对的整联蛋白，实际上只发现 20 种，提示这些亚基出现在细胞表面的位置可能具有特异性。整联蛋白同细胞外基质中黏着蛋白的识别与结合分为两种类型：一类是同 RGD 区域结合，另一类则不需要 RGD 区域（表 4-4）。

RGD 序列与临床研究

大多数细胞外基质蛋白之所以能够与整联蛋白结合，是因为它们含有“精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸”（arginine-glycine-aspartic acid）三肽序列，按照氨基酸的单字母命名，简写为 RGD 序列。这种三肽序列常存在于纤连蛋白、层黏连蛋白、胶原和各种其他细胞外基质蛋白的细胞结合位点。整联蛋白与 RGD 序列的识别与结合需要二价阳离子 Mg^{2+}和 Ca^{2+}，以维持整联蛋白同配体结合的正确构型。

表 4-4 根据 RGD 序列的识别进行的整联蛋白受体的分类

RGD 识别		非 RGD 识别	
受体	主要配体	受体	主要配体
$\alpha_3\beta_1$	纤连蛋白	$\alpha_1\beta_1$	胶原
$\alpha_5\beta_1$	纤连蛋白	$\alpha_2\beta_1$	胶原
$\alpha_V\beta_1$	纤连蛋白		核纤层蛋白
	血纤蛋白原	$\alpha_3\beta_1$	胶原
$\alpha_{11b}\beta_3$	纤连蛋白		核纤层蛋白
	von Willebrand 因子	$\alpha_4\beta_1$	纤连蛋白
	玻连蛋白		VCAM
	血纤蛋白原	$\alpha_6\beta_1$	层黏连蛋白
$\alpha_V\beta_3$	纤连蛋白	$\alpha_L\beta_2$	ICAM-1
	von Willebrand 因子		ICAM-2
	玻连蛋白	$\alpha_M\beta_2$	血纤蛋白原
$\alpha_V\beta_5$	玻连蛋白		ICAM-1
$\alpha_V\beta_6$	纤连蛋白		

人们很早就注意到，许多细胞能够紧紧地附着在有纤连蛋白的培养瓶上。如果将细胞放入已合成了含有 RGD 序列的肽培养液中，细胞就不能够附着到培养瓶上，因为合成的肽能够成功地用 RGD 序列同细胞表面的整联蛋白结合。据估计，约有半数的整联蛋白含有 RGD 结合位点。相同的细胞外蛋白可以与不同的整联蛋白结合，同样会有同一个整联蛋白能够同多个不同的细胞外蛋白结合。尽管功能上有重叠，但敲除小鼠实验表明，缺少了不同的整联蛋白的亚基具有不同的表型，从而推测大多数整联蛋白具特异性。

RGD 序列在细胞黏着中重要性的发现，为临床研究和处理受体-配体相互作用开辟了新天地。病变的动脉中血块的形成能够阻塞血液向主要器官的流通是引起心脏病突发和休克的主要原因之一。血块的聚集始于血小板的聚集，而血小板的聚集需要血小板特异的整联蛋白（$\alpha_{11b}\beta_3$）与可溶性的含有 RGD 序列的血蛋白，如血纤蛋白原（fibrinogen）、von Willebrand 因子的相互作用，这些蛋白作为接头将血小板聚集起来。动物实验表明，含有 RGD 的肽能够抑制血块的形成，这一发现，使我们能够人工合成含有 RGD 序列的新临床治疗剂，这种治疗剂不是肽，但含有 RGD 序列，可以治疗血小板凝集。另外也可以制备特异的抗 $\alpha_{11b}\beta_3$ 整联蛋白的抗体用于临床治疗。

4.3 细胞识别与黏着

在多细胞的生命有机体中，不同类型的细胞必须组成不同的组织，如脊椎动物中的肌肉组织、上皮组织、神经组织、结缔组织等（图 4-35）。

细胞识别（cell recognition）指细胞对同种或异种细胞、同源或异源细胞以及对自己和异己分子的认识和鉴别。细胞黏着（cell adhesion）则是指相邻细胞或细胞与细胞外基质以某种方式黏合在一起，组成组织或与其他组织分开，这种黏合的方式比较松散。另外从事件发生的次序来说，细胞识别在先，细胞黏着在后，识别是黏着的基础。就细胞组成组织而言，组织内各细胞间更为紧密的结合则是靠各种形式的连接。

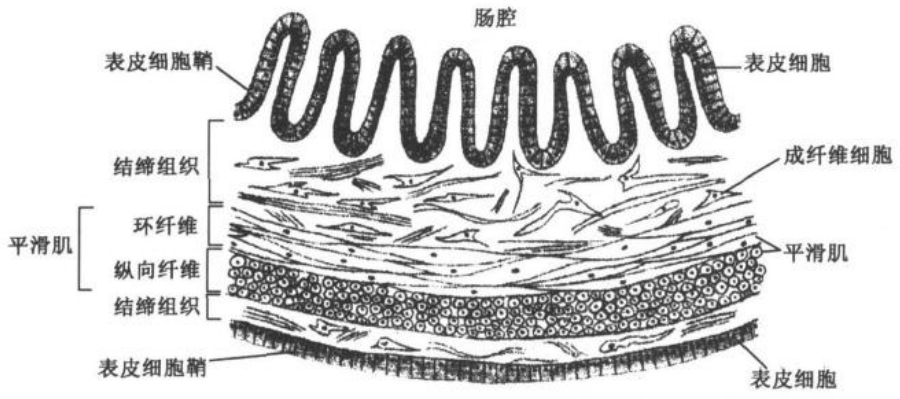


图 4-35　哺乳动物细胞肠壁的组织结构（引自 Alberts *et al*., 1994）

4.3.1　细胞识别及识别反应

在多细胞生物中，单个细胞要组成精密的组织和器官以及器官体系，首先必须具有相互识别的能力，然后通过黏着和连接将细胞组织起来。生物学家早在 1907 年就发现细胞具有相互识别的能力，从那以后，科学家们不断认识细胞间选择性的识别、黏着，对参与细胞识别和黏着的细胞表面分子的认识和了解越来越深入。

4.3.1.1　细胞识别的特性

多细胞生物有机体中有 3 种识别系统：抗原-抗体的识别，酶与底物的识别，细胞间的识别。第三类包括通过细胞表面受体与胞外信号分子的选择性相互作用，从而导致一系列的生理生化反应的信号传递。无论是哪一种识别系统，都有一个共同的基本特性，就是具有选择性，或是说具有特异性。

细胞识别是细胞发育和分化过程中一个十分重要的环节，细胞通过识别和黏着形成不同类型的组织，由于不同组织的功能是不同的，所以识别本身就意味着选择。

为了研究细胞的识别和黏着，1907 年 Wilson 通过实验研究两种不同颜色的海绵细胞的行为。分别从黄色海绵和红色海绵中分离单细胞，然后将两种不同颜色的细胞类群混合在一起。但是，这两种类型的海绵细胞很快就各自分开聚集，红色海绵细胞聚集到一起，黄色海绵细胞也是如此，二者互不混淆。这是人类最早通过实验认识到细胞具有识别和选择性结合的能力。此后，在许多生物中都发现了细胞的识别和黏着，不仅是简单的多细胞生物，也包括复杂的有各种组织分化的多细胞生物中不同组织的细胞都具有这种能力和特性。

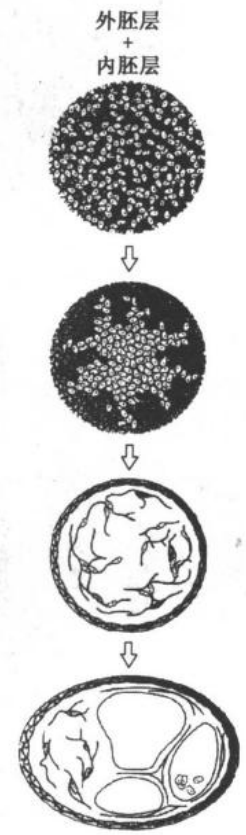


图 4-36　细胞识别的实验证明（引自 Karp, 1996）

有人用两栖类胚性细胞做实验，研究细胞的识别。分别用蛋白酶将外胚层和中胚层水解成单细胞，并分别标记上不同的颜色，然后将这两种细胞混合。在混合之初，它们混合得很好，但是随着时间的推移，外胚层的细胞移向外侧，并聚集在一起，这也是它们在胚胎中的正确位置；来自中胚层的细胞移向内侧，这也是它们在胚胎中的正确位置。这两种游离的细胞迅速重新聚集成团后，同种细胞形成独立的聚合体，每种聚合体只含一种颜色的细胞（图4-36），这种现象称为拣出（sorting out）。这一实验说明了细胞的识别具有选择性，非同类的细胞不会混合聚集。

4.3.1.2 细胞识别与黏着的分子基础

为了研究细胞识别和黏着的分子基础，建立了一种抗体检测黏着分子的方法。其原理是：当发现某种抗体能够阻止细胞间的识别和黏着，那么细胞表面能够同抗体结合的蛋白分子很可能就是介导细胞识别和黏着的蛋白质分子（图4-37）。20世纪70年代，Edelman和他的同事用这种方法从神经组织鉴定了一种膜糖蛋白，定名为神经细胞黏着分子（neural cell adhesion molecule，N-CAM），当胚性细胞直接与抗N-CAM的抗体接触，细胞就不能相互结合形成正常的组织。

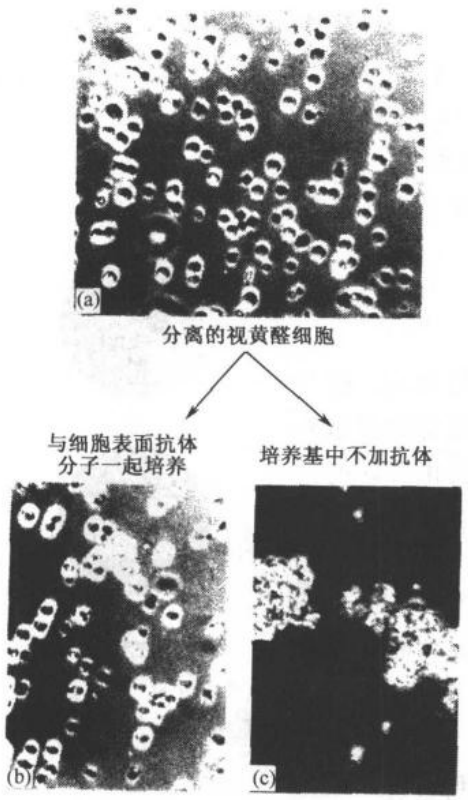


图4-37 用抗体检测细胞识别和黏着分子
（引自 Kleinsmith *et al*.，1995）
首先制备特异的抗体，然后分离鸡的视网膜细胞，再用不同的培育方法检测细胞黏着。（a）分离的且分散很好的鸡视网膜细胞；（b）加入抗体后阻止了细胞识别和黏着；（c）不加抗体，细胞发生识别和黏着。

N-CAM是膜糖蛋白，至少以3种形式存在，但都是由同一基因编码。其中两种是跨膜蛋白，第三种共价结合在细胞质膜的外表面。无论是何种存在方式，N-CAM分子都有一部分伸出到细胞外表面。3种N-CAM的细胞外结构都一样，都含有与细胞黏着相关的结合位点（图4-38）。

为了研究N-CAM结合的机制，分离纯化了

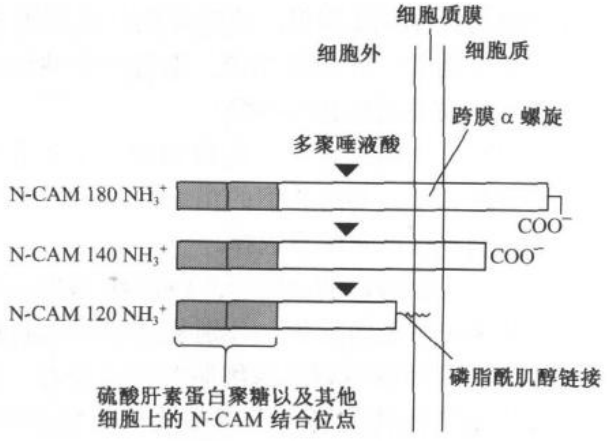


图4-38 成熟的N-CAM的3种形式
（引自 Lodish *et al*.，1995）
N-CAM 180和N-CAM 140都是通过α螺旋的跨膜区结合在膜上，而N-CAM 120则是通过磷脂酰肌醇锚定在膜上。这三种不同大小的N-CAM是在mRNA成熟加工拼接不同形成的。

N-CAM，然后加入到人工磷脂脂质体中。结果，人工脂质体能够相互黏着，但是加入了相应的抗体就不会发生黏着，不加 N-CAM 的人工脂质体也不会发生黏着。根据这些实验结果可以推测：细胞黏着是由细胞质膜中的蛋白分子介导的，在该实验中，N-CAM 就是介导细胞黏着的分子。

利用抗体阻止细胞黏着实验，发现了另一类参与细胞黏着的黏着分子——钙黏着蛋白(cadherin)。钙黏着蛋白也是细胞质膜中的细胞黏着分子，但是这种分子介导的细胞黏着受 Ca^{2+} 的调节。钙黏着分子家族中比较熟知的属于膜整合糖蛋白的成员有：E－钙黏着蛋白(主要在表皮组织中)、N－钙黏着蛋白(存在神经组织中)、P－钙黏着蛋白(主要存在于胎盘)。

通过培养的一种成纤维细胞——L 细胞研究了钙黏着蛋白在细胞黏着中的作用。L 细胞相互黏着的能力很低，但是将克隆的编码 E－钙黏着蛋白或 P－钙黏着蛋白的基因导入 L 细胞，使得 L 细胞具有合成 E－或 P－钙黏着蛋白的能力并能够进行相互黏着（图 4-39）。用基因克隆的方法使 L 细胞产生的钙黏着蛋白与自然细胞合成的钙黏着蛋白是相同的。这些实验结果说明钙黏着蛋白也是介导细胞黏着的分子。

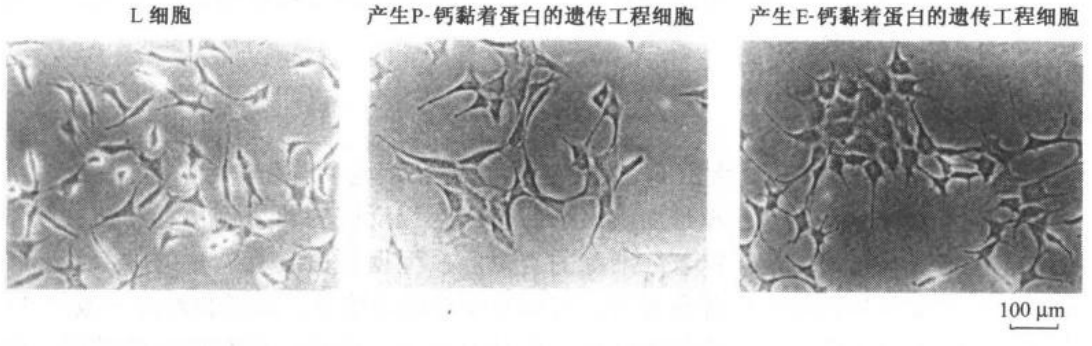


图 4-39　钙对细胞黏着的影响（引自 Kleinsmith *et al*.，1995）

由于 N-CAM 和钙黏着蛋白都是糖蛋白，那么黏着蛋白中的糖起什么作用呢？

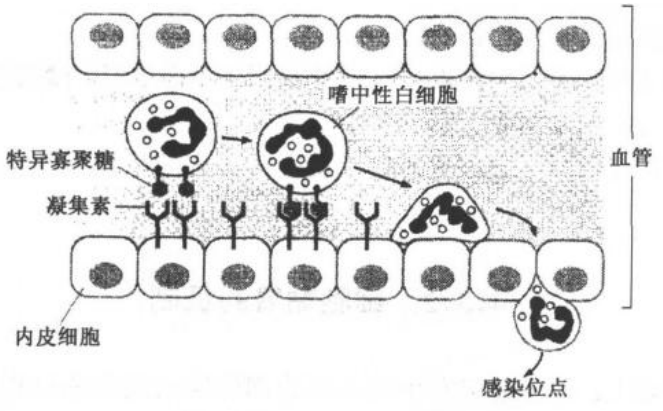


图 4-40　中性细胞表面糖在识别中的作用（引自 Alberts *et al*.，1998）

一种特异的跨膜蛋白（图中所示是凝集素）是由血管细胞（内皮细胞）合成的，它负责对化学信号的识别，主要是识别血液循环中嗜中性白细胞表面所携带的特异的糖脂或糖蛋白上的糖基。识别之后，嗜中性白细胞穿过血管的细胞壁进入到被感染的部位，进行保护反应。

可以这样设想：细胞的黏着主要靠黏着蛋白，而细胞识别则是糖的作用，特别是糖被在细胞识别过程中起着十分重要的作用。糖被中糖蛋白和糖脂的侧链虽然很短（有些还不足 15 个糖单位），但是由于它们能以不同的方式结合，所以能够形成不同的识别基团。在多细胞的生物中，细胞的糖被可作为识别的标志，如同警察的制服，赋予细胞的某种特征，并让其他与之相互作用的细胞识别，例如精细胞对卵细胞的识别。另外，糖被也涉及炎症反应。例如在细菌感染的初期，嗜中性白细胞表面的糖被感染部位血管内皮细胞表面的凝集素识别，这种识别引起嗜中性白细胞同血管的黏着，然后穿过血管进入感染组织，消灭掉入侵的病菌（图 4-40）。

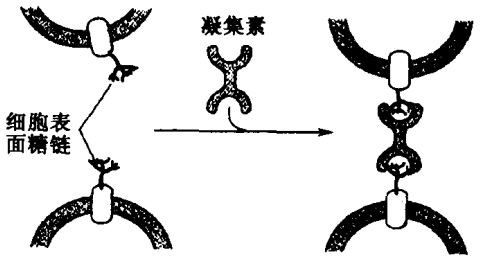


图 4-41　凝集素的作用机制
（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

凝集素（lectin）是动物细胞和植物细胞都能够合成和分泌的、能与糖结合的蛋白质，在细胞识别和黏着反应中起重要作用，主要是促进细胞间的黏着。凝集素具有一个以上同糖结合的位点，因此能够参与细胞的识别和黏着，将不同的细胞联系起来（图 4-41）。

4.3.1.3　识别反应

细胞识别引起的细胞反应，大致有 3 种类型：内吞、细胞黏着和信号反应。

红细胞衰老并被脾脏细胞吞噬是细胞识别后引起吞噬反应的典型例子。红细胞膜中糖脂的糖基除了与血型有关外，还决定着红细胞的寿命。血型糖蛋白含有大量的唾液酸，糖链末端唾液酸的存在状况与红细胞的寿命相关，可作为被吞噬的信号。红细胞寿命一般为 3～4 个月，然后在脾脏中被吞噬。用唾液酸酶处理分离的红细胞，除去红细胞中的唾液酸，然后将这种红细胞重新注入到原来的动物体内，发现注入的红细胞很快在脾脏中被吞噬，而没有除去唾液酸的正常的红细胞则相安无事。究其原因，当唾液酸被除去之后，暴露出的半乳糖残基可能是红细胞衰老的标记被脾脏细胞识别，并将之吞噬，这个例子既说明了细胞识别后的反应，又说明了糖在识别过程中的作用。

识别后的第二种反应则是发生黏着，包括细胞同细胞外基质的黏着以及细胞与细胞的黏着。进一步发展就成为细胞连接。

识别后的第三种反应就是引起信号转导，发生一系列的生理生化反应，使细胞更好地适应环境。

4.3.2　细胞黏着的机制

在细胞识别的基础上，同类细胞发生聚集形成细胞团或组织的过程叫细胞黏着（cell adhesion）。它对于胚胎发育及成体的正常结构和功能都有重要的作用。在发育过程中，由于细胞间细胞黏着的强度不同，决定着细胞在内、中、外三胚层的分布。在器官形成过程中，通过细胞黏着，使具有相同表面特性的细胞聚集在一起形成器官。

4.3.2.1 细胞黏着分子

在细胞识别过程中，细胞的糖被起重要作用，而引起细胞黏着的主要是膜蛋白。参与细胞黏着的分子称为细胞黏着分子（cell adhesion molecule，CAM）。

自从 N-CAM 被发现之后，陆续发现了一些新的细胞黏着分子，如 Ng-CAM（neuroglia cell adhesion molecule）是神经胶质细胞黏着分子，L-CAM（liver-cell adhesion molecule）是肝细胞的细胞黏着分子，I-CAM（intercellular adhesion molecule）是普遍存在的一种细胞间黏着分子，它的配体是白细胞功能相关抗原 1（leucocyte function-associated antigen 1，LFA-1）；而 LECAM（leucocyte endothelial cell adhesion molecule）是白细胞内皮细胞中发现的细胞黏着分子。上述细胞黏着分子都是糖蛋白，在细胞外结构域都有与肽共价结合的糖基。根据细胞黏着分子的作用方式可分为三个家族：①免疫球蛋白超家族，如 V-CAM（vascular cell adhesion molecule）、Ng-CAM 和 I-CAM 等；②钙黏着蛋白家族，如 E－钙黏着蛋白、P－钙黏着蛋白、N－钙黏着蛋白；③选择蛋白家族，如 LEU-CAM1（即是后来的 L－选择蛋白）、E－选择蛋白、P－选择蛋白等。后两种家族的细胞黏着分子是钙依赖性的，而免疫球蛋白超家族则是非钙依赖性的。钙黏着蛋白家族是主要的一类黏着蛋白，分布极为广泛（表 4-5）。

表 4-5 钙黏着蛋白超家族中某些成员及功能

黏着蛋白	细胞分布	连接功能	在小鼠中失活引起的表型
E－钙黏着蛋白	表皮组织	黏着连接	胚泡期死亡；不能形成致密的胚
N－钙黏着蛋白	神经元、心脏、肺、骨骼肌、成纤维细胞	黏着连接	胚胎因心脏缺陷而死亡
P－钙黏着蛋白	胎盘、表皮、乳腺上皮细胞	黏着连接	腺体发育不正常
VE－钙黏着蛋白	内皮细胞	黏着连接	血管发育不正常（内皮细胞程序性死亡）

4.3.2.2 细胞黏着方式

经细胞黏着分子介导的细胞黏着可能有 3 种作用方式：①相邻两细胞表面由同种细胞黏着分子的相互介导黏着；② 相邻两细胞表面由互补的细胞黏着分子的相互作用介导黏着，互补分子可同时存在于同一细胞或不同细胞；③中介分子（如凝集素）介导的与细胞表面黏着分子的互补作用。

我们已经讨论到有 3 类细胞黏着分子参与细胞的黏着：①选择蛋白（类黏蛋白 CAMs）；②免疫球蛋白的超家族（IgSF）的某些成员；③钙黏着蛋白。此外，还有第 4 种类型：④整联蛋白家族中的某些成员。细胞黏着方式总结于图 4-42。

钙黏着蛋白介导细胞黏着

钙黏着蛋白家族至少有 30 个相关的糖蛋白介导 Ca^{2+} 依赖性的细胞黏着，并介导 ECM 中的信号向细胞质中的传递。在大多数不同类型的细胞表面都发现了钙黏着蛋白，该家族的不同成员在体内的分布也有特异性。研究较为清楚的钙黏着蛋白是 E－钙黏着蛋白（存在于表皮）、N－钙黏着蛋白（神经）、P－钙黏着蛋白（胎盘）。这些典型的钙黏着蛋白含有相当大的细胞外片段，其中有几个串起来的同质重复的结构域，决定其结合的特异性。钙黏着蛋白有一个跨膜区和一个细胞质结构域。

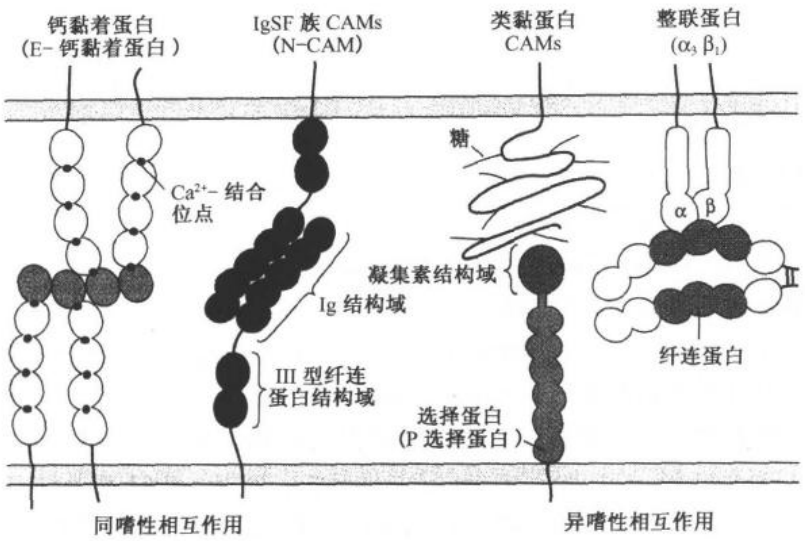


图 4-42　各种细胞黏着分子介导的细胞黏着（引自 Lodish *et al*., 1999）
钙黏着蛋白、IgSF、整联蛋白和选择蛋白介导的细胞黏着。钙黏着蛋白介导同嗜性的细胞黏着，整联蛋白和选择蛋白介导异嗜性的细胞黏着，而 IgSF 既能介导同嗜性也能介导异嗜性的细胞黏着。

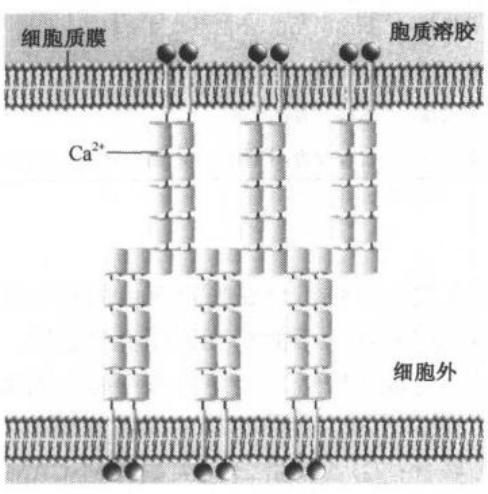


图 4-43　钙黏着蛋白介导的细胞黏着
（引自 Karp, 1999）

钙黏着蛋白介导相同细胞间的相互黏着，主要是通过双方细胞表面的钙黏着蛋白的相互作用(图 4-43)，也就是同嗜性的细胞黏着，即所谓的“自我黏着”，并且通过基因工程方法得到证明。钙黏着蛋白介导的同类细胞的黏着能力能够很好地解释为什么同类细胞具有“拣出”功能。钙黏着蛋白是将细胞组成组织并维持成年生物体内的组织有序性的最关键的因素。钙黏着蛋白通常以二聚体的形式介导细胞黏着，这样介导的细胞黏着的结合力较强，不仅如此，钙黏着蛋白常常以成丛的二聚体介导细胞黏着。如果仅以单体介导细胞黏着，结合力则很弱。

细胞质结构域常常与细胞质中的连环蛋白(catenin）相关联，该蛋白具有双重功能，一是将钙黏着蛋白与细胞质联系起来，同时向细胞质传递信息。细胞可通过改变膜的跨度或细胞内结构域来调节钙黏着蛋白的黏着。如 E-钙黏着蛋白细胞质膜结构域的磷酸化，对钙黏着蛋白与 β 连环蛋白的作用起正调节。

选择蛋白介导细胞黏着

选择蛋白（selectin）是膜整合糖蛋白的一个家族，它能够识别从另一个细胞表面伸展出

来的特异的糖基团，并与之特异性结合，因此它也是细胞表面受体。选择蛋白有一个小的细胞质结构域、一个单次跨膜的结构域、一个大的细胞外片段，在这个片段上可分为几个结构域，包括最外端的具有凝集素作用的结构域（图 4-44）。

已知有三种类型的选择蛋白：E-选择蛋白，它在内皮细胞表达；P-选择蛋白，在血小板和内皮细胞表达；L-选择蛋白，在各种类型的白细胞中表达。这 3 种选择蛋白都是识别小的出现在某些糖蛋白或糖脂的四糖基团，选择蛋白同糖配体的结合是 Ca^{2+} 依赖性的。选择蛋白主要介导循环中的白细胞在有炎症和血块的血管壁部位暂时性相互作用。与选择蛋白起作用的靶细胞上的蛋白通常称为黏蛋白（mucin）。

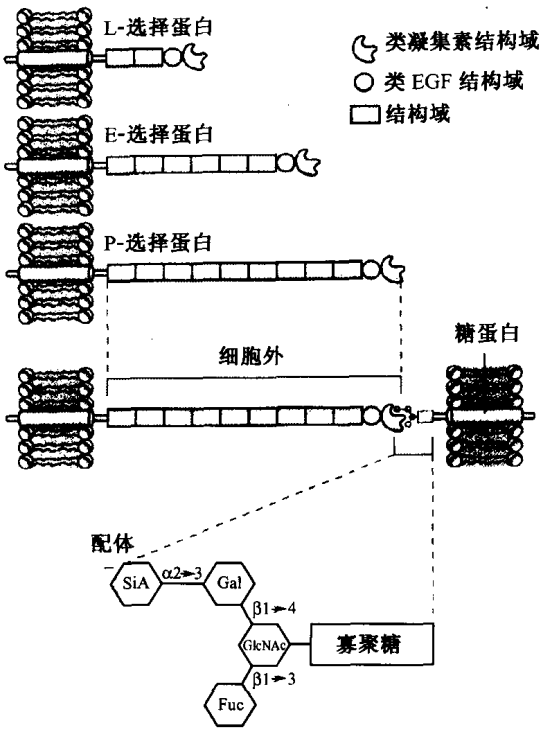


图 4-44　三种类型的选择蛋白的结构及选择蛋白介导的细胞黏着（引自 Karp, 1999）

免疫球蛋白与整联蛋白介导细胞黏着

20 世纪 60 年代发现抗体是对免疫反应认识的一个里程碑。抗体是一类称之为免疫球蛋白（Ig）的蛋白质分子，是由一些相似的小结构域组成的多肽分子。在 Ig 的每个结构域中，都是由 70～110 个氨基酸组成的紧密折叠的结构。后来在很多不同种类的蛋白质中也都发现有类 Ig 结构域的存在，这些结构同 Ig 抗体一起构成了免疫球蛋白超家族（immunoglobulin superfamily, IgSF）。IgSF 的大多数成员是整合膜蛋白，存在于淋巴细胞的表面，参与各种免疫活动。它们中的某些整合蛋白参与非钙依赖性的细胞之间的黏着。

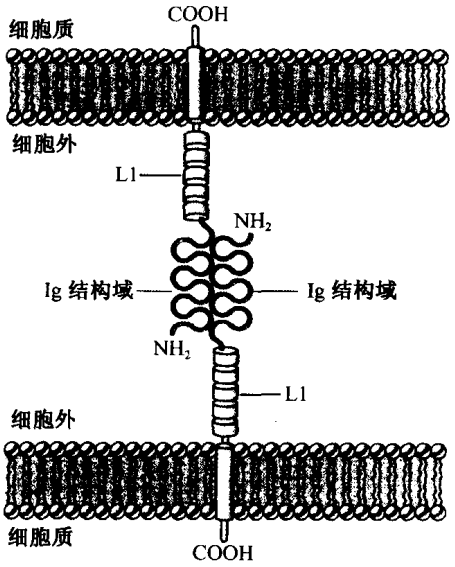


图 4-45　免疫球蛋白超家族的细胞黏着分子（引自 Karp, 1996）

图中所示是内皮细胞表面的一种 IgSF，V-CAM 的 N 端的结构以及两个相同细胞通过各自的 V-CAM 的相互作用介导的细胞黏着。V-CAM 与 L1 具有类似的三维结构。L1 是神经胶质细胞黏着分子。

大多数 IgSF 细胞黏着分子介导淋巴细胞与需要进行免疫反应的细胞（如巨嗜细胞、淋巴细胞）间的黏着反应，然而，某些 IgSF 成员，如 V-CAM、N-CAM 和 L1，在神经系统发育过程中，对于神经突起、突触形成等都有重要作用。像纤连蛋白以及其他一些参与细胞黏着的蛋白一样，IgSF 细胞黏着分子含有几个相同的结构域（图4-45）。

IgSF 黏着蛋白分子既能介导同嗜性的细胞黏着，又能介导异嗜性的细胞黏着，但多数是介导同嗜性的细胞黏着。如果介导同嗜性的细胞黏着，是非 Ca^{2+} 依赖性的，如果介导异嗜性的细胞黏着，则是 Ca^{2+} 依赖性的。一个细胞上的 IgSF 蛋白能够同另一细胞上相同或不同的 IgSF 蛋白结合介导细胞发生黏着。例如，一个细胞上的 L1 分子能够同另一细胞上的相同 L1 分子进行结合。另外，IgSF 超家族也可通过与整联蛋白结合介导细胞黏着，如位于某些血管内皮细胞上的 IgSF 蛋白能够与靶细胞表面的整联蛋白 $\alpha_4\beta_1$ 结合从而介导细胞黏着。

4.4 细胞连接

多细胞生物建立组织的首要反应是相互识别和黏着，但是仅此不足以建立组织以及维持组织的相对独立而又长期稳定，细胞间还必需建立更为密切的联系。细胞间建立长期的组织上的联系通常需要较复杂的结构，这种结构称为细胞连接（cell junction）。

细胞连接是细胞间的联系结构，是细胞质膜局部区域特化形成的，在结构上包括膜特化部分、质膜下的胞质部分及质膜外细胞间的部分。细胞连接是多细胞有机体中相邻细胞之间通过细胞质膜相互联系，协同作用的重要基础（图 4-46）。

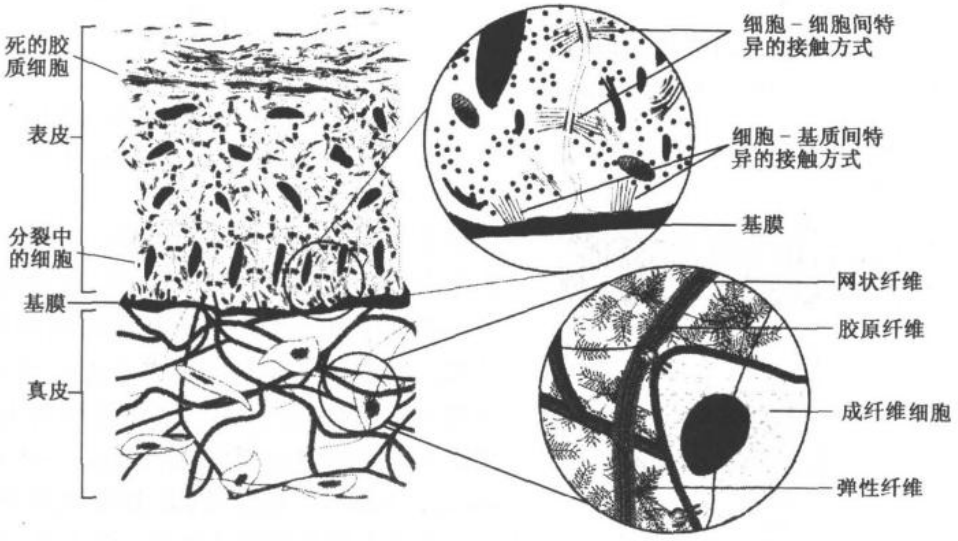


图 4-46　细胞的组织结构及相互作用（引自 Karp, 1999）

图示人的皮肤细胞上皮组织中各细胞间特殊的联系结构以及细胞外基质及基膜在组织形成中的作用。

4.4.1 细胞连接的概念和类型

细胞连接的描述性概念是指细胞表面的特化结构，或特化区域，两个细胞通过这种结构连接起来。细胞的特化区涉及细胞外基质蛋白、跨膜蛋白、胞质溶胶蛋白、细胞骨架蛋白等。从功能上看，细胞连接将同类细胞连接成组织，并同相邻组织的细胞保持相对稳定。

细胞黏着是细胞连接的起始，细胞连接是细胞黏着的发展。从时间上看，黏着在先，连接在后。从结构上看，细胞黏着涉及的分子较少、范围局部、结构简单；而细胞连接涉及的

蛋白分子较多、范围广、结构复杂，结合的紧密程度高。

动物细胞有 3 种类型的连接：紧密连接（tight junction）、斑块连接（plaque-bearing junction）、通讯连接（communicating junction），每一种连接都具有独特的功能：封闭（紧密连接）、黏着（斑块连接）和通讯。这 3 种类型的细胞连接中，斑块连接最为复杂，并且易同细胞黏着相混淆。根据斑块连接在连接中所涉及的细胞外基质和细胞骨架的关系又分为 4 种类型：桥粒、半桥粒、黏着带和黏着斑。

上皮组织是机体的保护层，也是各种连接较为集中的部位（图 4-47），不同的连接以特殊的方式排列，上皮组织中的这些不同的连接方式合称为连接复合物（junction complex）。

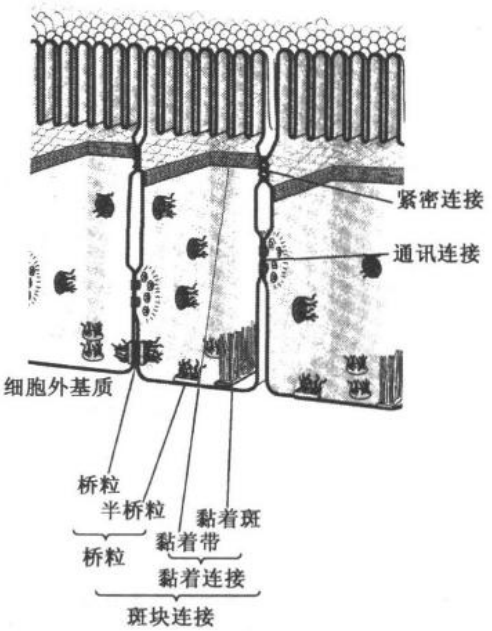


图 4-47　动物细胞中主要几种类型的细胞连接（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

4.4.2　紧密连接

紧密连接是 Farquhar 和 Palade 在 1963 年发现的，有两种英文名称：tight junction 和 zonula occludens，又称为不通透连接（impermeable junction）。

4.4.2.1　紧密连接的结构

紧密连接通常位于上皮顶端两相邻细胞间，图 4-48 是上皮两相邻细胞紧密连接的电子显微镜照片，从图中可见相邻两细胞的紧密连接处的细胞质膜几乎融合并紧紧结合在一起，在融合部位，两细胞间基本没有空隙，所以紧密连接部分完全封闭了连接处的液体流通。

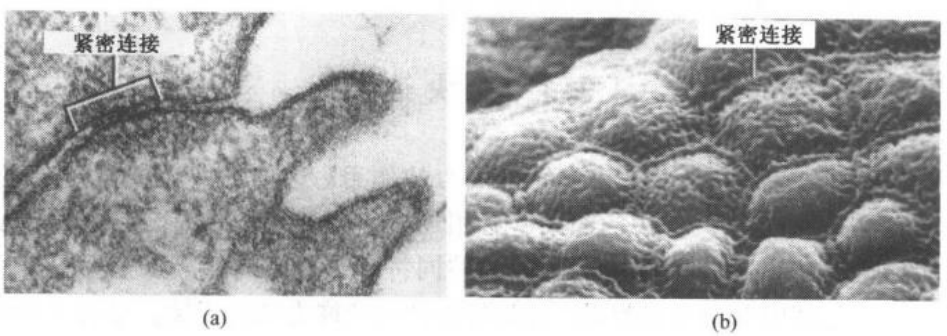


图 4-48　肌组织毛细管的细胞间的紧密连接（引自 Karp, 1999）

(a) 上皮细胞切片观察到的紧密连接；(b) 扫描电子显微镜观察的上皮顶部细胞周围的环状紧密连接。

现已分离纯化了紧密连接的整合蛋白，并命名为缝合蛋白（occludin）。从结构上看，相邻两细胞间的紧密连接是靠紧密蛋白颗粒重复形成的一排排的连接线将两相邻细胞连接起来，

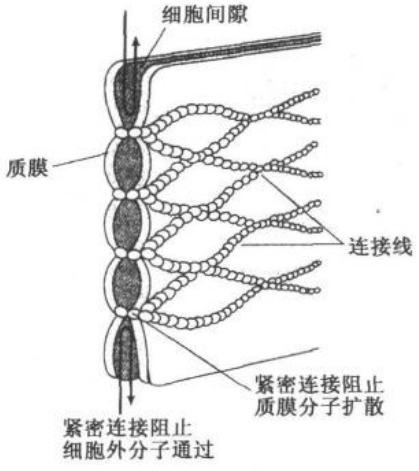


图 4-49 紧密连接的模式结构
（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）
显示紧密蛋白在相邻两细胞的紧密连接中的排列方式，可见两个细胞的紧密连接处是融合在一起的。

这些蛋白质颗粒的直径只有几个纳米，它们形成连续的纤维，就像是焊接线一样，将相邻细胞连接起来，并封闭了细胞间的空隙。根据电子显微镜观察的结果绘制了紧密连接的模式结构（图 4-49）。

4.4.2.2 紧密连接的功能

从功能上看，紧密连接除了连接细胞之外，还有两个作用：防止物质双向渗漏，并限制了膜蛋白在脂分子层的流动，维持细胞的极性。

紧密连接能够阻止细胞外液中的物质从细胞层的一侧流向另一侧，紧密连接的这种限制作用对于膀胱一类器官特别重要。在膀胱中必须严格防止尿液回流到组织，另外肠道中的物质进入体液也必须仔细调节控制。这些分子从细胞层的一侧移向另一侧的惟一途径就是通过运输蛋白来精确控制。

不过，紧密连接对细胞间隙的封闭作用不是绝对的。一些实验证明，紧密连接对小分子物质有一定的通透性，而且不同类型的上皮细胞紧密连接对离子的通透能力不同。例如小肠上皮与膀胱上皮的紧密连接对离子的通透率可相差 1 万倍。据推测，对离子隔离作用的大小与紧密连接中连接线的数目多少有关，似乎一条连接线构成一道独立的屏障。

紧密连接除了具有渗透障碍作用之外，还影响表皮细胞质膜的极性。例如，肠道表皮细胞含有不同运输蛋白位于肠道表面的细胞质膜，而位于基底面的细胞质膜含较少运输蛋白。由于脂层是流动的，靠什么来阻止蛋白质在质膜中随机分布？实验证明紧密连接起了重要作用。将表皮细胞放在缺少 Ca^{2+} 的溶液中，在这种条件下可以使紧密连接破坏，随着钙的去除，原先分布在细胞一端的膜蛋白能够随机分布于整个质膜。由此可见，紧密连接阻止膜蛋白从一侧向另一侧的扩散，从而维持着细胞的极性。

4.4.3 斑块连接*

大多数组织和器官都要受相邻细胞的机械力的作用，这种机械力相当强，且有破坏性。为了维持组织结构的稳定性，组织内的细胞必须连接起来使组织具有一定的机械强度。对于此种意义上的细胞连接，都有一个十分重要的共同特点：所有的连接都是通过细胞质膜内侧的斑块（plaque）与细胞骨架连接起来，故此将这种连接称为斑块连接。也有人将这种连接称

---

* 多数作者将这种连接称为黏着连接，这是因为这种连接涉及很多黏着蛋白，特别涉及膜整合蛋白。由于英文的“黏着”单词很多，如 adhesive，adhesion，另外还有一个目前尚未收集到的英汉词典中的 adheren，都是具有黏着的意思，所以将这种连接称为黏着连接，并不会同黏着连接中的黏着带、黏着斑的黏着连接混淆，因为只要换一个英文单词即可，而汉语则难以区分开。虽然 Alberts 用锚定连接进行区别，但没有斑块连接形象，故此本书使用斑块连接以便与黏着连接相区别。

为锚定连接（anchoring junction），因为这种连接主要是通过跨膜蛋白进行细胞锚定的。

斑块连接是动物各组织中广泛存在的一种细胞连接方式，通过黏着蛋白、整联蛋白和细胞骨架体系以及细胞外基质的相互作用，将相邻两细胞连接在一起。根据跨膜蛋白是同肌动蛋白纤维相连还是同中间纤维相连，将斑块连接分为黏着连接（黏着带、黏着斑）和桥粒（桥粒和半桥粒）两大类。

4.4.3.1 黏着连接

在斑块连接中，如果连接作用涉及细胞质中的骨架是肌动蛋白，这种连接方式就称为黏着连接（adheren junction，zonula adheren）。根据黏着连接涉及的是两个细胞间的连接还是细胞与细胞外基质的连接，又分为两种情况：若涉及相邻两细胞间的连接，则称为黏着带（adhesion belt），如果是细胞同细胞外基质相连，则称为黏着斑（focal adhesion）。

细胞与细胞的黏着连接：黏着带

黏着带连接位于上皮细胞紧密连接的下方，靠钙黏着蛋白同肌动蛋白相互作用，将两个细胞连接起来（图 4-50）。黏着带处相邻细胞质膜的间隙为 20～30nm，介于紧密连接和桥粒之间，所以又叫中间连接（intermediate junction）或带状桥粒。

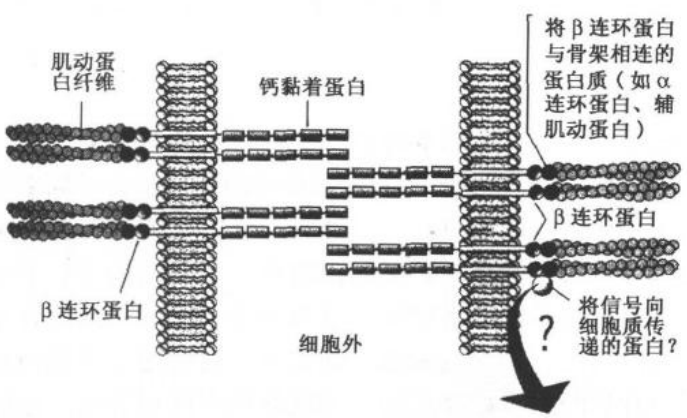


图 4-50 黏着带连接的结构（引自 Karp，1999）

图示是黏着带的结构模式图。细胞黏着分子——钙黏着蛋白的细胞质部分通过连接蛋白（如β连环蛋白）同细胞骨架的肌动蛋白相连，而两细胞间则是靠钙黏着蛋白的相互作用将两细胞连接起来。

参与黏着带连接的主要蛋白是钙黏着蛋白和肌动蛋白。钙黏着蛋白是一种跨膜糖蛋白，属 Ca^{2+} 依赖性的细胞黏着分子，所以这种连接也是钙依赖性的。在黏着带连接中，钙黏着蛋白的细胞外结构域同相邻细胞质膜上另一个钙黏着蛋白的细胞外结构域相互作用形成桥，使相邻细胞互相连接，但并不融合，保留有 20～30nm 的细胞间隙，看起来是宽宽的的带。钙黏着蛋白的细胞内结构域经细胞质斑（cytoplasmic plaque）中的蛋白介导同肌动蛋白纤维相连，细胞质斑中含有β连环蛋白（β-catenin）、α连环蛋白等（α-catenin）等，其中β连环蛋白直接与钙黏着蛋白的细胞质端相连，然后通过另一个蛋白介导与肌动蛋白纤维相连。

黏着带的细胞质斑是一种松散的结构，其位置正好在细胞质膜的细胞质面，细胞质斑起锚定肌动蛋白纤维的作用。另外，推测在细胞质斑中可能还有其他能引起细胞信号转导的蛋

白质，当钙黏着蛋白同肌动蛋白建立联系之后，信号转导蛋白通过某种方式引起细胞内其他一些应答。

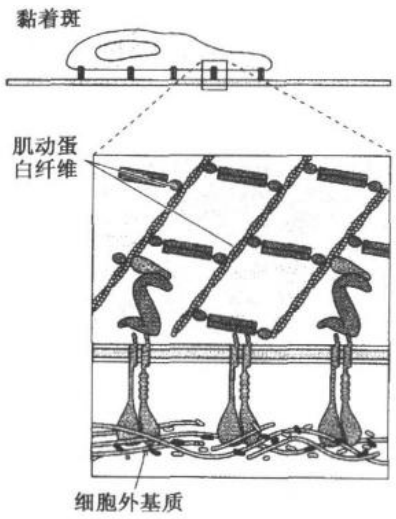


图 4-51　细胞-细胞外基质的黏着连接：黏着斑连接（引自 Cooper，2000）

细胞-细胞外基质黏着连接：黏着斑

黏着斑与黏着带的根本区别是：黏着斑是细胞与细胞外基质进行连接（图 4-51），而黏着带是细胞与细胞间的黏着连接。除了这一根本区别之外，还有其他一些不同：①参与黏着带连接的膜整合蛋白是钙黏着蛋白，而参与黏着斑连接的是整联蛋白，即细胞外基质受体蛋白；②黏着带连接实际上是两个相邻细胞膜上的钙黏着蛋白与钙黏着蛋白的连接，而黏着斑连接是整联蛋白与细胞外基质中的纤黏连蛋白的连接，因整联蛋白是纤黏连蛋白的受体，所以黏着斑连接是通过受体与配体的结合。

在黏着斑连接中，整联蛋白的细胞质部分同样要由细胞质斑的介导同细胞骨架的肌动蛋白纤维相连。不过细胞质斑中的蛋白成分与黏着带连接有所不同，它含有踝蛋白，这种蛋白在其他的细胞质斑中是不存在的。

无论是何种黏着连接，都有 3 个基本特点：①都是钙依赖性的，因为钙黏着蛋白和整联蛋白的活性都受 Ca^{2+} 的调节；②都要通过细胞质斑中的蛋白质介导同细胞骨架的肌动蛋白相连；③无论是钙黏着蛋白还是整联蛋白，一旦同肌动蛋白相连，都会与某种信号分子发生联系，引起细胞的信号转导。由此看来，黏着连接的两个主要功能是：①通过膜整合蛋白、细胞骨架的肌动蛋白、细胞外基质黏连蛋白将细胞与细胞或细胞与细胞外基质连接起来；②通过膜整合蛋白与肌动蛋白相连，给细胞传递一种信号，然后通过细胞内的信号分子将信号放大。另外，钙黏着蛋白介导的细胞黏着连接与细胞黏着间既有联系，也有差别，联系是二者都与钙黏着蛋白有关，差别主要是：黏着连接必然与细胞骨架有关，而钙黏着蛋白介导的细胞黏着则不然。

4.4.3.2　桥粒

在斑块连接中，如果细胞是通过中间纤维锚定到细胞骨架上，这种黏着连接方式就称为桥粒（desmosome），这是桥粒连接与黏着连接的根本区别。如同黏着连接，桥粒连接也分为两种情况：如果涉及的是相邻两细胞间的连接，则称为桥粒（即完全桥粒）；如果是细胞同细胞外基质相连，则称为半桥粒（hemidesmosome）。

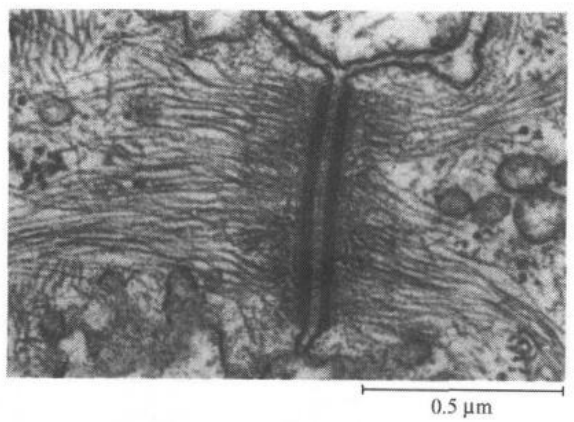


图 4-52　桥粒连接的电子显微镜照片（引自 Becker *et al*., 1996）
图中所示是两个皮肤细胞间桥粒连接。

桥粒（完全桥粒）　又称为斑点黏着（maculae adheren），是最常见的连接方式，主要出现在上皮组织，如皮肤和肠组织。桥粒连接的形态像圆盘，直径大约为1μm（图4-52），桥粒连接能赋予组织机械强度。从形态上看，通过桥粒连接，两细胞间形成纽扣式的结构。桥粒连接处相邻细胞质膜间的间隙约30nm，细胞质斑的厚度为15～20nm。

从结构上看，桥粒连接也是通过钙黏着蛋白将两个相邻细胞结合起来。参与桥粒连接的钙黏着蛋白与黏着连接中的钙黏着蛋白在结构上有所不同。有两种类型参与桥粒连接的钙黏着蛋白，分别称为桥粒芯蛋白（desmoglein）和桥粒芯胶黏蛋白（desmocollin）。在细胞质膜的内表面有一致密的细胞质斑，作为锚定细胞骨架中间纤维的位点（图4-53），锚定是通过细胞质斑中的桥粒斑蛋白（desmoplakin）介导的，桥粒斑蛋白也是钙黏着蛋白。网状的中间纤维网络不仅提供了将周围细胞连成一体的结构组成，同时还增加了细胞的机械强度。由此可见，钙黏着蛋白在维持上皮细胞组织的整体性方面具有重要作用，临床上有一种自我免疫症——天疱疮，就是丧失上皮细胞的桥粒连接而患上严重的皮肤水泡。

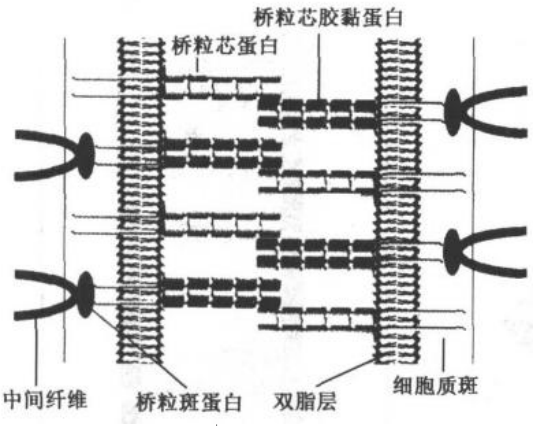


图4-53　桥粒连接的分子结构（引自 Karp，1999）

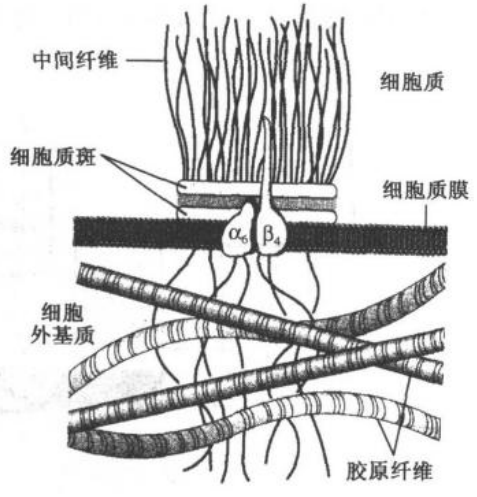


图4-54　半桥粒连接的分子结构（引自 Karp，1999）

半桥粒　在桥粒连接中如果跨膜糖蛋白的细胞外结构域不是与另一细胞的跨膜蛋白相连，而是与细胞外基质相连，形态上类似半个桥粒，这种连接称为半桥粒。与桥粒连接相比有两点不同：首先是参与连接的跨膜蛋白不是钙黏着蛋白而是整联蛋白；第二是整联蛋白的细胞外结构域不是与相邻细胞的整联蛋白相连而是同细胞外基质相连，已经从半桥粒中分离到$\alpha_6\beta_4$。半桥粒主要位于上皮细胞的底面，作用是把上皮细胞与其下方的基膜连接在一起（图4-54）。

斑块连接是最为复杂的细胞连接方式，涉及的黏着蛋白较多，为便于比较和记忆，将它们涉及的黏着蛋白与细胞骨架总结于表4-6。

表 4-6　斑块连接涉及的黏着蛋白与细胞骨架

连接方式	跨膜黏着蛋白	胞外配体	胞内细胞骨架	细胞质斑蛋白
细胞与细胞				
黏着带	钙黏着蛋白（E-钙黏着蛋白）	相邻细胞的钙黏着蛋白	肌动蛋白纤维	α和β连环链蛋白、黏着斑蛋白、α-辅肌蛋白、桥粒斑珠蛋白
桥粒	钙黏着蛋白（桥粒芯蛋白、桥粒芯胶黏蛋白）	相邻细胞桥粒芯蛋白、桥粒芯胶黏蛋白	中间纤维	桥粒斑蛋白、桥粒斑珠蛋白
细胞与基质				
黏着斑	整联蛋白	细胞外基质蛋白	肌动蛋白纤维	踝蛋白、黏着斑蛋白、α-辅肌蛋白、细丝蛋白
半桥粒	整联蛋白 $\alpha_6\beta_4$	细胞外基质蛋白	中间纤维	网蛋白

4.4.3.3　细胞黏着在细胞与环境互作中的作用

我们曾讨论了由细胞黏着分子介导的4种不同的细胞黏着，又讨论了由细胞黏着分子介导的4种黏着连接（黏着带、黏着斑、桥粒和半桥粒），如果不考虑同细胞骨架的关系，共有6种不同的细胞黏着方式（图4-55），包括4种细胞间黏着和2种细胞与细胞外基质的黏着。

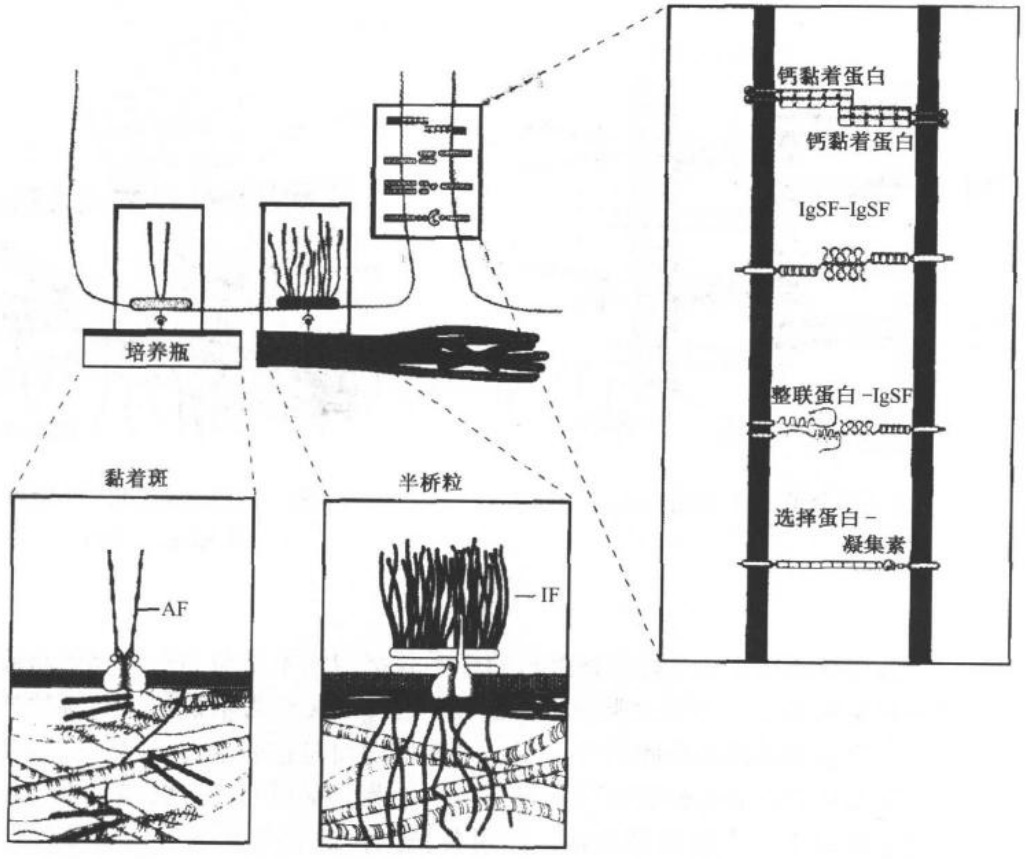


图 4-55　通过细胞表面发生的6种不同的作用方式（引自 Karp, 1999）

有4种类型的细胞黏着，都是通过细胞表面分子介导的细胞-细胞互作后发生的。有2种类型的细胞与细胞外物质发生的互作，这两种互作都与细胞骨架相关。应注意：这6种方式并非是一种类型的细胞能够同时具有，为叙述方便，合在一起。

细胞的这些互作方式对于相对固定细胞，增强组织的强度具有重要作用。特别是细胞骨架的参与，使同一组织的细胞能够紧密地结合在一起。细胞中的中间纤维网络通过桥粒和半桥粒锚定在质膜上，加固了上皮细胞之间及上皮细胞与其下方结缔组织之间的连接。桥粒与半桥粒如同铆钉一样，对上皮及其下方结缔组织所承担的机械张力和剪力起了分散作用。而细胞质膜的肌动蛋白是细胞膜骨架的主要成分，这种骨架成分通过黏着带和黏着斑将相邻细胞的质膜或质膜与细胞外基质蛋白联系在一起，不仅增强了组织的机械强度（图 4-56），更重要的是形成了组织网络和组织整体。

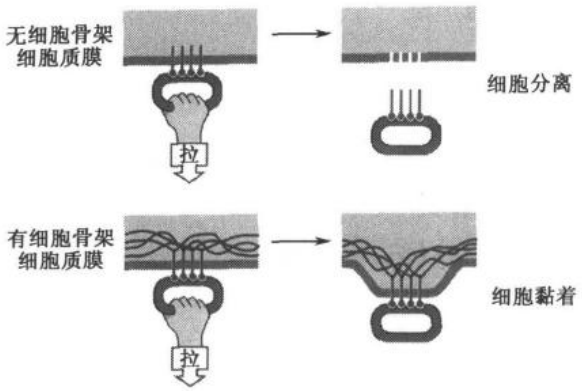


图 4-56　细胞骨架在细胞黏着中的重要性
（引自 Alberts *et al*., 1994）

4.4.4　通讯连接

通讯连接一种特殊的细胞连接方式，位于特化的具有细胞间通讯作用的细胞。它除了有机械的细胞连接作用之外，还可以在细胞间形成电偶联或代谢偶联。动物与植物的通讯连接方式是不同的，动物细胞的通讯连接为间隙连接（gap junction），而植物细胞的通讯连接则是胞间连丝（plasmodesmata）。

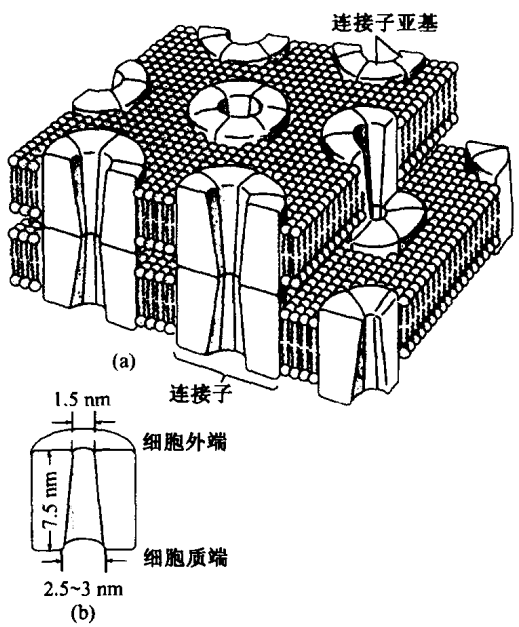


图 4-57　间隙连接的结构（引自 Wolfe，1993）
（a）间隙连接的结构。相邻两细胞各提供一个连接子，并对接，在两细胞质膜中形成圆柱形的通道。每个连接子由4个或6个连接蛋白亚基构成环形结构。（b）连接子的二维结构。在通道的细胞质面有一个帽形的门，能够开放或关闭，调节通道中物质的移动。

4.4.4.1　间隙连接

间隙连接是 1967 年被发现的，是动物细胞第 3 种类型的连接方式。间隙连接为相邻细胞中离子和小分子的流通打开了一个直接的通道，不过，这种通道是没有选择性的，只要分子足够小就可以通过。间隙连接广泛存在于脊椎和无脊椎动物几乎所有类型的细胞中，尤其是需要进行快速通讯的细胞中特别丰富，如神经细胞和肌细胞。

间隙连接的主要结构是连接子（connexon）。所谓“间隙”，有两层含义，其一是在间隙连接处，相邻细胞质膜间有 2～3nm 的间隙；其二是相邻两细胞通过连接子对接形成通道，允许小分子的物质直接

通过这种通道从一个细胞流向另一个细胞（图 4-57）。

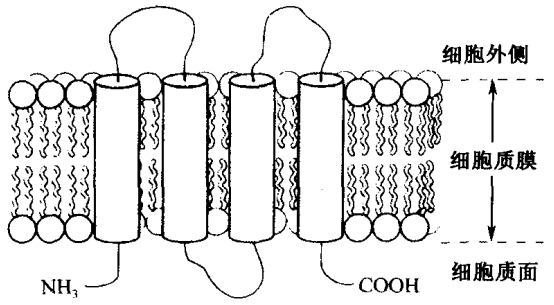


图 4-58　连接蛋白的跨膜区和连接环
（引自 Wolfe，1993）

连接子是一种跨膜蛋白。每个连接子由 4 个或 6 个相同或相似的连接蛋白（connexin）亚基环绕中央形成孔径为 1.5～2nm 的水性通道；相邻两细胞分别用各自的连接子相互对接形成细胞间的通道，允许相对分子质量在1 200Da以下的分子通过。不同组织来源的连接子的分子质量大小有很大差别，最小的为 24kDa，最大的可达 46kDa。连接子的大小虽然不同，但所有的连接子结构相同：都有 4 个 α 螺旋的跨膜区和一个细胞质连接环（图 4-58）。将分离纯化的连接蛋白加入到人工脂质体，能形成有功能的间隙连接，这一实验结果说明，连接蛋白是间隙连接的基本结构单位，并能进行自我装配。

实验还证明间隙连接能够允许离子和小分子自由通过。Loewenstein 将染料注入用间隙连接连起来的一排昆虫细胞中的一个，然后在光学显微镜下观察，发现染料很快从一个细胞移向下一个细胞，而且比预料的要快得多。这种染料是亲水性的，分子质量为 300Da。他们还用类似的实验证明了离子能够自由通过间隙连接。在 Loewenstein 的实验中能够自由通过间隙连接的最大分子是1 200Da，这说明其他的一些小的信号分子如 cAMP 和 IP_3 等也能自由通过。

Gilula 和他的同事们通过实验获得了第二信使自由通过间隙连接的直接证据。他们用了两种培养的细胞系，一种是卵巢细胞，这种细胞没有去甲肾上腺素的受体，所以不会对去甲肾上腺素或其他的胆碱激素做出应答。另外一个细胞系是心肌细胞，具有这种激素的受体，并受该激素的刺激。当将这两种细胞放在一起培养时，它们很快通过间隙连接连成一体，当加入去甲肾上腺素时，不仅心肌细胞做出了应答，卵巢细胞也做出了应答。这一结果说明卵巢细胞之所以能够对去甲肾上腺素做出反应，是从心肌细胞得到了第二信使的结果。

上述实验以及后来的一些实验都证明间隙连接不仅具有机械连接作用，还能在细胞间形成电偶联（electrical coupling）和代谢偶联（metabolic coupling）。电偶联在神经冲动信息传递过程中起重要作用。代谢偶联可使小分子代谢物和信号分子通过间隙连接形成的水性通道，从一个细胞到另一个细胞。如 cAMP 和 Ca^{2+} 等都可通过间隙连接从一个细胞进入到相邻细胞，因此，只要有部分细胞接受信号分子的作用，可使整个细胞群发生反应。同时在偶联的细胞之间，可以合用和“互喂”许多营养物质。

对肿瘤细胞间隙连接的研究表明：恶性肿瘤细胞的通讯能力存在缺陷，癌基因或其产物对细胞间通讯起抑制作用。当用一种皮肤致癌剂佛醇二酯加入人肿瘤细胞培养液中，细胞间电偶联的比例从 90％下降到 6％，除去佛醇二酯后，电偶联逐渐恢复。因此认为致癌剂起着抑制连接通讯作用。有理由推测，细胞间的通讯抑制使癌变中的细胞失去正常细胞的调控作用，这可能是癌变的一个重要因素。

在胚胎发育过程中，间隙连接介导的细胞通讯显得尤为重要。在胚胎发育的一定阶段，一部分细胞与另一部分细胞失去偶联，开始向各自特定的方向发展，而同一部分这群细胞则

保持互相偶联，以协调的方式循行同一方向发展，表现出整体性。有一种假说认为：在胚胎发育的一定阶段，某种小分子物质可以通过间隙连接从高浓度区域移到低浓度区域，从而在一群细胞之间建立一个平缓的浓度梯度。这种区域性的浓度向这群细胞提供了它们自身的“位置信息”，可以让它们按其在胚胎中的位置而调控其分化方向。

间隙连接的作用受细胞质中 Ca^{2+} 和 H^+ 浓度的调节。间隙连接在低 Ca^{2+} 浓度时开放，此时的细胞质处于静息状态；当 Ca^{2+} 浓度升高时，间隙连接的通道逐步缩小，当 Ca^{2+} 浓度达到 $10^{-5}mol \cdot L^{-1}$ 时，通道完全关闭。提高 H^+ 浓度，也就是将细胞质中 pH 值从 7.0 降低到 6.8 或更低，间隙连接的通道也会关闭。间隙连接除了受 Ca^{2+} 和 H^+ 调节外，还受其他的因素调节。

4.4.4.2 胞间连丝

虽然植物细胞没有动物细胞所具有的特异性的连接方式，又有着较厚的细胞壁，但是细胞壁并没有完全封闭细胞。植物细胞壁通常含有小的开口，叫胞间连丝，通过它，细胞间进行连接。在电子显微镜下见到的胞间连丝似乎是一个狭窄的、直径约 30～60nm 的圆柱形细胞质通道穿过相邻的细胞壁。胞间连丝中有连丝微管（desmotubule）通过，并认为它是由两个细胞的光面内质网衍生而来（图 4-59，图 4-60）。

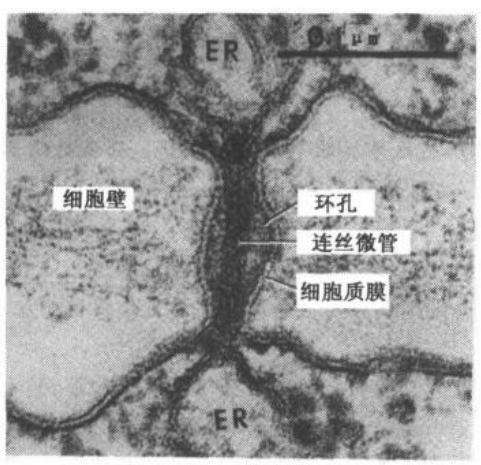


图 4-59 胞间连丝的电子显微镜照片
（引自 Karp，1996）

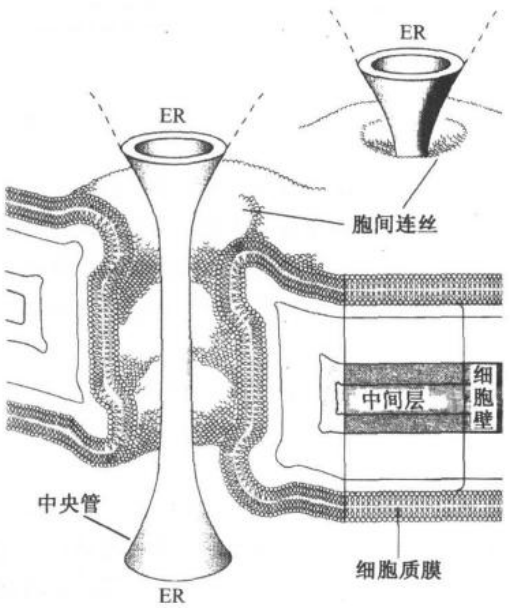


图 4-60 胞间连丝的模式图
（引自 Wolfe，1993）

胞间连丝不仅使相邻细胞的细胞质膜、细胞质、内质网交融在一起。而且也是植物细胞间物质运输和传递信息的重要渠道，它与动物细胞的间隙连接有许多相同之处。正常情况下它允许1 000Da 以下的分子渗透，也能让离子自由通过，它的活性同样受 Ca^{2+} 浓度的调节等，因此具有植物信号传导的作用。

与间隙连接不同的是，胞间连丝的孔能够扩张，允许大分子，包括蛋白质和 RNA 分子

通过。这是20世纪80年代通过研究病毒经植物细胞的胞间连丝从一个细胞向另一个细胞扩散时发现的，另外还发现病毒编码一种能够同植物细胞胞间连丝的壁相互作用的移动蛋白(movement protein)，这种蛋白能够增加胞间连丝孔的直径。后来的研究发现，植物能够自己合成移动蛋白介导细胞间的大分子运输。

我们分别讨论了细胞中三大类细胞连接，现将它们的功能、主要特点等总结于表4-7。

表4-7　细胞连接的方式与特点

连接类型	功能	特征	膜间间隙	相关结构
紧密连接	封闭细胞空间	沿着嵴进行膜连接	无间隙	跨膜连接蛋白
斑块连接				
黏着带	细胞-细胞黏着连接	形成连续的黏着带	20～25nm	与肌动蛋白纤维相连
黏着斑	细胞-ECM黏着连接	形成局部的黏着点	20～25nm	与肌动蛋白纤维相连
桥粒	细胞-细胞黏着连接	形成局部的黏着点	20～35nm	与中间纤维相连
半桥粒	细胞-基膜黏着连接	形成局部的黏着点	20～35nm	与中间纤维相连
通讯连接				
间隙连接	动物细胞间离子和分子的交换	连接子(具有3nm孔径的跨膜蛋白)	2～3nm	两个细胞通过各自的连接子对接形成通道
胞间连丝	植物细胞间的物质交换	两细胞间形成直径为30～60nm通道	无间隙	内质网穿过两细胞壁

提　要

多细胞生命有机体中的细胞组成不同的组织，在这些组织中，通过细胞相互间以及细胞与细胞外环境的相互作用调节着细胞的迁移、生长以及组织的三维结构。

动物是由多种类型的细胞组成的有机体，而且不同类型的细胞通常要组成固定的组织。在多数组织中，细胞要向细胞外分泌一群大分子，这些大分子在细胞间交织连接形成网状结构，将这种结构称为细胞外基质。

细胞外基质的组成可分为3大类：①蛋白聚糖，它们能够形成水性的胶状物；②结构蛋白，如胶原和弹性蛋白，它们赋予细胞外基质一定的强度和韧性；③黏着蛋白，如纤连蛋白和层黏连蛋白，它们促使细胞同基质结合。

细胞识别，指细胞对同种或异种细胞、同源或异源细胞以及对自己和异己物质分子的认识和鉴别。细胞黏着则是指相邻细胞或细胞与细胞外基质以某种方式黏合在一起，组成组织或与其他组织分开，这种黏合的方式比较松散。另外从事件发生的次序来说，细胞识别在先，细胞黏着在后，识别是黏着的基础。

细胞在识别和黏着的基础上进行细胞连接。细胞连接有3种方式：紧密连接、斑块连接、通讯连接。比较复杂的是斑块连接，它又可分为4种连接方式：黏着带、黏着斑、桥粒、半桥粒。对它们的区别主要是根据连接蛋白与细胞骨架的关系以及是否是细胞与细胞的连接，还是细胞与细胞外基质的连接。

5 细胞通讯

英国诗人 John Donne 用诗句 “No man is an island” 表示人离开了社会将寸步难行，细胞也是如此，因为细胞也是生活在社会之中，只不过是细胞社会。

多细胞生物是由不同类型的细胞组成的社会，而且是一个开放的社会，社会中的单个细胞间必须协调它们的行为，为此，细胞建立通讯联络是必需的。如生物体的生长发育、分化、各种组织器官的形成、组织的维持以及它们各种生理活动的协调，都需要有高度精确、高效的细胞间通讯机制。因此，细胞通讯（cell communication）是指：在多细胞生物的细胞社会中，细胞间或细胞内通过高度精确和高效地接收信息的通讯机制，并通过放大引起快速的细胞生理反应，或者引起基因活动，而后发生一系列的细胞生理活动来协调各组织活动，使之成为生命的统一体对多变的外界环境做出综合性反应。

即便是单细胞生物，如酵母、细菌，也同多细胞生物一样，都必须对它们的周围环境有所知晓，并能迅速作出反应。如摄取营养、区分光明和黑暗、检测和避免毒性的伤害等，这些行为也需要通过信号转导。

5.1 细胞通讯的基本特点

人类文明的重要标志之一就是通讯技术。当今社会人们可以通过电视、电话以及电子网络等方式进行信息交流。无论是何种通讯方式，接收方必须通过视、听设备接收发射方发出的信息，并转换成能够识别的信息，最后作出反应。细胞的通讯与人类社会的通讯有异曲同工之妙（图 5-1）：由信号发射细胞发出信号（接触和产生信号分子），由信号接收细胞（靶细胞）探测信号，其接收的手段是通过接收分子（受体蛋白），然后通过靶细胞的识别，最后做出应答。因此细胞通讯是细胞社会更高层次的活动，而且是生物体的生存所必需的。

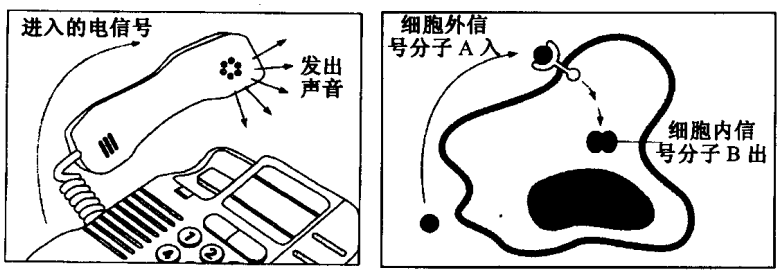


图 5-1 信号转导（引自 Alberts *et al*.，1998）

（a）电话接收器将电信号转换成声音信号；（b）细胞将细胞外信号（分子 A）转变成细胞内的信号（分子 B）。

5.1.1 细胞通讯的方式

在人类社会中有各种不同的信息传导和接收的方式，而且还可通过互访和远足的方式进行交流。在多细胞的生物体中，除了红细胞及防御性细胞等少数几种细胞能够远足之外，绝大多数细胞一生中都必须坚守岗位，因此细胞社会有着非常特别的信号传导和接收系统，其效率比人类社会有过之而无不及。

5.1.1.1 通讯方式

细胞有三种通讯方式（图 5-2）：①通过信号分子；②通过相邻细胞表面分子的黏着；③通过细胞与细胞外基质的黏着。第一种不需要细胞的直接接触，完全靠配体与受体的接触传递信息，后两种都需要通过细胞的接触。所以可将细胞通讯的方式分为两大类：①不依赖于细胞接触的细胞通讯；②依赖于细胞接触的细胞通讯。

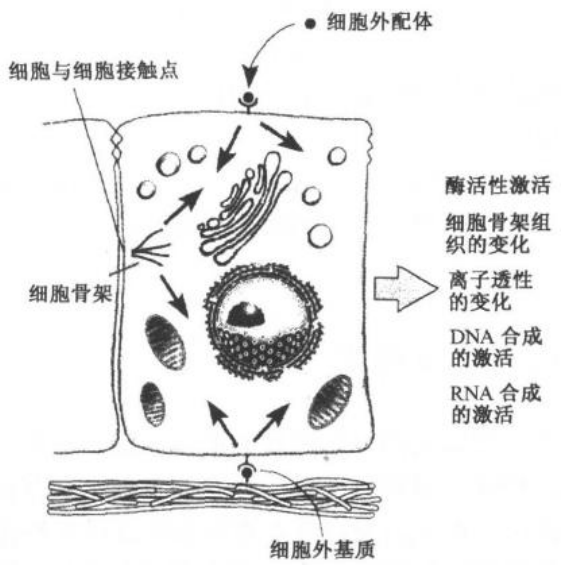


图 5-2 细胞通讯的方式及引起的某些反应
（引自 Karp, 1996）
含有受体的细胞质膜与可溶性的配体、细胞外基质、以及相邻细胞表面成分进行特异性的结合，引起细胞内的信号反应，并引起细胞内某些酶活性的改变、离子通透性的改变、细胞骨架结构的变化以及基因表达的变化等。

5.1.1.2 细胞通讯的反应

细胞通讯中有两个基本概念：细胞信号传导（cell signaling）和信号转导（signal transduction），前者强调信号的产生与细胞间传送，后者强调信号的接收与接收后信号转换的方式（途径）和结果。这两个概念反映了细胞通讯的两个最主要的反应过程。概括起来，细胞通讯包括以下几个基本过程：①信号分子的合成：一般的细胞都能合成信号分子，而内分泌细胞是信号分子的主要来源。②信号分子从信号生成细胞释放到周围环境中：这是一个相当复杂的过程，特别是蛋白质类的信号分子，要经过内膜系统的合成、加工、分选和分泌，最后释放到细胞外。③信号分子向靶细胞运输：运输的方式有很多种，但主要是通过血液循环系统运送到靶细胞。④靶细胞对信号分子的识别和检测：主要通过位于细胞质膜或细胞内受体蛋白的选择性的识别和结合。⑤细胞对细胞外信号进行跨膜转导，产生细胞内的信号。⑥细胞内信号作用于效应分子，进行逐步放大的级联反应，引起细胞代谢、生长、基因表达等方面的一系列变化。

另外，细胞完成信号应答之后，要进行信号解除，终止细胞应答，主要是通过对信号分子的修饰、水解或结合等方式降低信号分子的水平和浓度以终止反应。

上述过程的前 3 步是细胞信号传导的主要内容，即信号的合成、分泌与传递；后 3 个过

程则是信号转导的主要内容，即信号的识别、信号的转移和信号转换。

5.1.2 信号分子及信号传导

5.1.2.1 信号分子

细胞信息多数是通过信号分子（signal molecule）传递的。所谓信号分子是指生物体内的某些化学分子，既非营养物，又非能源物质和结构物质，而且也不是酶，它们主要是用来在细胞间和细胞内传递信息，如激素、神经递质、生长因子等统称为信号分子，它们的惟一功能是与细胞受体结合并传递信息。

多细胞生物体中有几百种不同的信号分子在细胞间传递信息，这些信号分子中有蛋白质、多肽、氨基酸衍生物、核苷酸、胆固醇、脂肪酸衍生物以及可溶解的气体分子等。

根据信号分子的溶解性分为水溶性信使（water-soluble messenger）和脂溶性信使（lipid-soluble messenger），前者作用于细胞表面受体，后者要穿过细胞质膜作用于胞质溶胶或细胞核中的受体。

其实，信号分子本身并不直接作为信息，它的基本功能只是提供一个正确的构型及与受体结合的能力，就像钥匙与锁一样，信号分子相当于钥匙，因为只要有正确的形状和缺齿就可以插进锁中并将锁打开。至于锁开启后干什么，由开锁者决定了。

5.1.2.2 信号分子的类型及信号传导方式

概括起来，细胞传导信息的信号分子及信号传导方式大致分为 3 种类型：激素、局部介质和神经递质（图 5-3）。

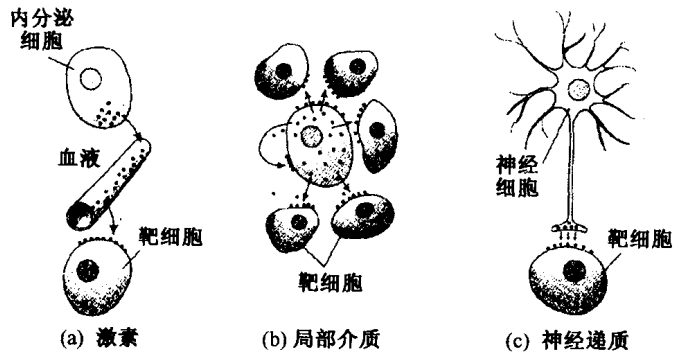


图 5-3 3 种不同类型的信号分子及其信号传导方式（引自 Kleinsmith *et al.*, 1995）

激素

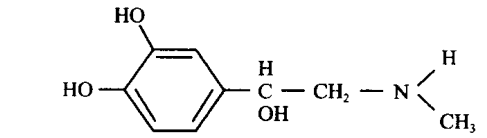
激素（hormone）是由内分泌细胞（如肾上腺、睾丸、卵巢、胰腺、甲状腺、甲状旁腺和垂体）合成的化学信号分子，这些信号分子被分泌到血液中后，经血液循环运送到体内各个部位作用于靶细胞。激素经血液循环系统运到全身的速度很快，通常只需几分钟时间。每种激素都有与其相配的一种或几种受体；一种内分泌细胞基本上只分泌一种激素，参与细胞通讯的激素有 3 种类型：蛋白与肽类激素、类固醇激素、氨基酸衍生物（表 5-1）。

表 5-1 某些激素的性质和功能

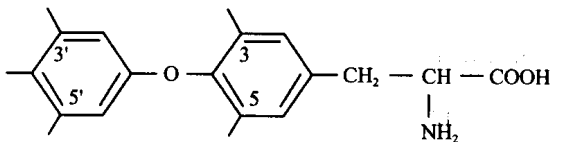
名称	合成部位	化学特性	主要作用
肾上腺素	肾上腺	酪氨酸衍生物	提高血压、心律、增强代谢
皮质醇	肾上腺	类固醇	在大多数组织中影响蛋白、糖、脂的代谢
雌二醇	卵巢	类固醇	诱导和保持雌性副性征
胰高血糖素	胰 α 细胞	肽	在肝、脂肪细胞刺激葡萄糖合成、糖原断裂、脂断裂
胰岛素	胰 β 细胞	蛋白质	刺激肝细胞等葡萄糖吸收、蛋白质及脂的合成
睾酮	睾丸	类固醇	诱导和保持雄性副性征
甲状腺素	甲状腺	酪氨酸衍生物	刺激多种类型细胞的代谢

通过激素传递信息是最广泛的一种信号传导方式，这种通讯方式的距离最远，覆盖整个生物体。在动物中，产生激素的细胞是内分泌细胞，所以将这种通讯称为内分泌信号传导(endocrine signaling)。

蛋白质和肽类激素（protein and peptide hormone） 此类激素在脊椎动物细胞中占80%，甚至更多。组成此类激素的肽链长度变化很大，短的为3个氨基酸残基，多的有几百个氨基酸残基。此类激素通常只与细胞质膜受体结合。



(a) 肾上腺素



(b) 甲状腺素

图 5-4 肾上腺素与甲状腺素的结构

类固醇激素（steroid hormone） 该类激素是在光面内质网上利用胆固醇酶促合成的。由于此类激素不溶于水，所以通常与血液中蛋白质结合，然后通过血液循环运送到靶细胞。与蛋白质或肽激素不同的是，类固醇激素能够穿过靶细胞的质膜作用于靶细胞内受体。

氨基酸衍生物（amino acid derivative） 主要是由酪氨酸衍生而来的小分子激素，如肾上腺素和甲状腺素（图 5-4）。肾上腺素是由肾上腺以及一些神经细胞合成的，因此属于神经递质激素。肾上腺素和它的衍生物作用于膜受体，而甲状腺素则穿过细胞质膜与细胞内受体结合。

局部介质

局部介质（local mediator）是由各种不同类型的细胞合成并分泌到细胞外液中的信号分子，它只能作用于周围的细胞。在这种通讯方式中，信号分子分泌出来之后停留在分泌细胞周围的细胞外液体中，只是将信息传递给相邻细胞，通讯距离很短，只有几毫米。有时这种信号分子也作用于分泌细胞本身。通常将这种信号传导称为旁分泌信号传导（paracrine signaling），以便与自分泌信号相区别。如生长因子（growth factor）就是局部介质，它能够调节多细胞生物的细胞生长和分裂，作用的靶细胞主要是邻近的细胞。另一类信号蛋白，淋巴因子（lymphokine），主要是控制免疫系统细胞的发育及其他行为，也只作用于局部区域。

局部介质中除了蛋白质和肽类分子外，还有氨基酸和脂肪酸衍生物（表 5-2）。前列腺素(prostaglandin, PG)是由前列腺合成分泌的脂肪酸衍生物（主要是由花生四烯酸合成的）。前列腺素不仅能够控制邻近细胞的活性，也能作用于合成前列腺素细胞自身，通常将由自身

合成的信号分子作用于自身的现象称为自分泌信号传导（autocrine signaling）。

表 5-2　某些局部介质的性质和功能

名称	来源	化学性质	作用
表皮生长因子(EGF)	多种细胞	蛋白质	刺激表皮和多种其他类型细胞的增殖
血小板生长因子(PDGF)	多种细胞，包括血小板	蛋白质	刺激多种类型细胞增殖
神经生长因子(NGF)	各种神经组织	蛋白质	帮助某些神经元的生存，促进这些神经元轴突的生长
组胺	肥大细胞	组氨酸的衍生物	引起血管扩张渗漏，引起炎症
一氧化氮(NO)	神经细胞、血管内皮细胞	溶解气体	引起平滑肌松弛，调节神经细胞的活性

神经递质

神经递质（neurotransmitter）是从神经末梢释放出来的小分子物质，是神经元与靶细胞的化学信使。在它们作用于靶细胞之前，突触必须同靶细胞挨得很近，这是因为神经递质扩散的距离有限。另外，为了引起邻近靶细胞的反应，还必须产生一种电信号，所以神经递质仅作用于与之相连的靶细胞。神经递质释放后，作用速度快，部位精确，维持时间短，与受体的亲和力低。由于神经递质是神经细胞分泌的，所以这种信号传导又称为神经信号传导（neuronal signaling）。

表 5-3　某些神经递质的性质和功能

名称	来源	化学性质	某些作用
乙酰胆碱	神经末梢	胆碱衍生物	在许多神经肌突触和中央神经肌肉系统产生兴奋的神经递质
γ-氨基丁酸（GABA）	神经末梢	谷氨酸衍生物	在中央神经系统抑制神经递质

5.1.2.3　依赖于细胞接触的信号传导

我们讨论了不依赖于细胞的接触，即通过分泌信号分子传导信号的方式。细胞信号传导的另一种方式就是通过细胞的接触，包括通过细胞黏着分子介导的细胞间黏着、细胞与细胞

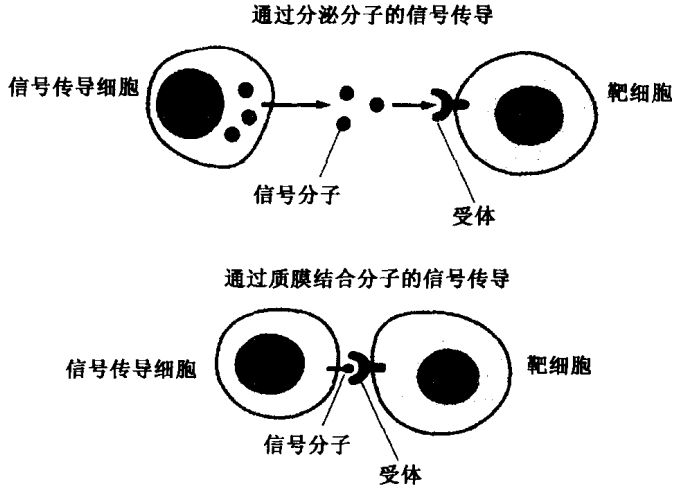


图 5-5　通过分泌的信号分子通讯与通过膜结合的信号分子通讯的比较（引自 Alberts *et al*., 1998）

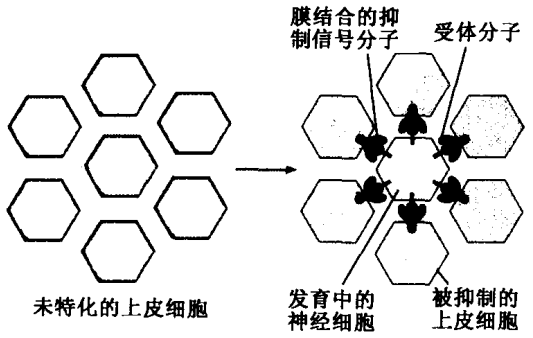


图 5-6 依赖于细胞接触的信号传导对神经细胞产生的控制（引自 Alberts *et al*., 1998）

外基质的黏着、连接子（植物细胞为胞间连丝）介导的信号传导。

在通过细胞接触进行的通讯中，信号分子位于细胞质膜上，两个细胞通过信号分子与受体的接触传递信息。所以，无论是通过分泌的信号分子进行的细胞通讯还是通过膜结合的信号分子接触进行的细胞通讯，信号分子都起重要作用（图 5-5）。

在胚胎发育过程中，依赖于细胞接触的信号传导在组织的形成中具有重要作用。例如 δ 蛋白（*Delta* 蛋白）是一类依赖于细胞接触的信号分子，是跨膜蛋白，位于神经元及各种胚性细胞。这些部位的细胞开始时都是相同的，通过依赖于细胞接触进行的信号传导作用，分别进入不同的分化途径形成特化的细胞（图 5-6）。

5.1.3 受体与信号的接收

受体（receptor）在细胞生物学中是一个很泛的概念，意指任何能够同激素、神经递质、药物或细胞内的信号分子结合并能引起细胞功能变化的生物大分子。

在细胞通讯中，由信号传导细胞送出的信号分子必须被靶细胞接收才能触发靶细胞的应答，接收信息的分子称为受体，信号分子被称为配体（ligand）。在细胞通讯中受体通常是指位于细胞膜表面或细胞内与信号分子结合的蛋白质。

5.1.3.1 受体存在的部位

与信号分子识别并结合的受体通常位于细胞质膜或细胞内。位于细胞质膜上的受体称为表面受体（surface receptor），位于胞质溶胶、核基质中的受体称为细胞内受体（intracellular receptor）。细胞表面受体主要是识别周围环境中的活性物质或被相应的信号分子所识别，并与之结合，将外部信号转变成内部信号，以启动一系列反应而产生特定的生物效应。

细胞表面受体

表面受体多为膜上的功能性糖蛋白，也有由糖脂组成的，如霍乱毒素受体、百日咳毒素受体；有的受体是糖脂和糖蛋白组成的复合物，如促甲状腺素受体。若仅为由一条多肽链组成的受体，称单体型受体，若由两条或两条以上的多肽链组成的则称聚合型受体。

表面受体主要是同大的信号分子或小的亲水性信号分子作用，传递信息。而细胞内受体主要是同脂溶性的小信号分子作用（图 5-7）。

细胞内受体

细胞内受体主要位于细胞核，也有些位于胞质溶胶中，位于胞质溶胶中受体要与相应的配体结合后才可进入细胞核。胞内受体识别和结合的是能够穿过细胞质膜的小的脂溶性信号分子，如各种类固醇激素、甲状腺素、维生素 D 以及视黄酸。细胞内受体的基本结构都很相

似，有极大的同源性。细胞内受体通常有两个不同的结构域，一个是与 DNA 结合的结构域，另一个是激活基因转录的 N 端结构域。此外还有两个结合位点，一个是与配体结合的位点，位于 C 端，另一个是与抑制蛋白结合的位点，在没有与配体结合时，则由抑制蛋白抑制了受体与 DNA 的结合，若是有相应的配体，则释放出抑制蛋白（图 5-8）。

细胞内受体在接受脂溶性的信号分子并与之结合形成受体-配体复合物后就成为转录促进因子，作用于特异的基因调控序列，启动基因的转录和表达。对类固醇激素受体这种功能的

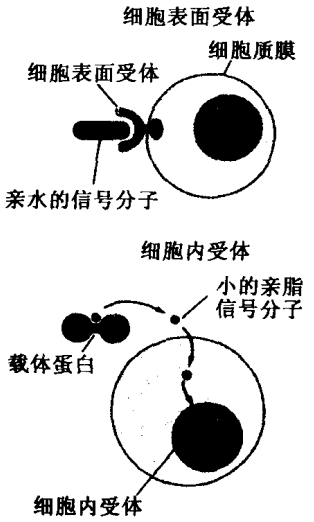


图 5-7　细胞表面受体与细胞内受体
（引自 Alberts *et al*., 1998）

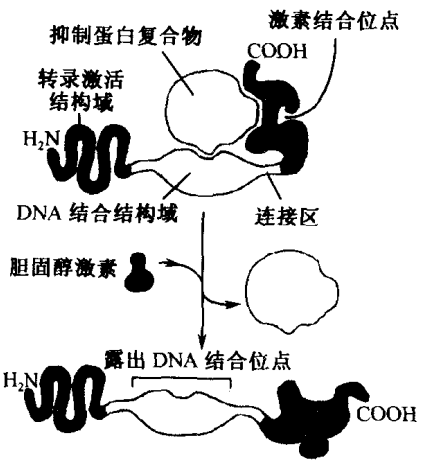


图 5-8　细胞内受体的模式结构
（引自 Alberts *et al*., 1998）
受体中有两个结构域和两个结合位点。在非活性状态，受体与抑制蛋白复合物结合（该复合物含有热休克蛋白 Hsp90）。当配体与受体结合，使得抑制蛋白复合物与受体脱离，因而暴露出与 DNA 结合的结构域。

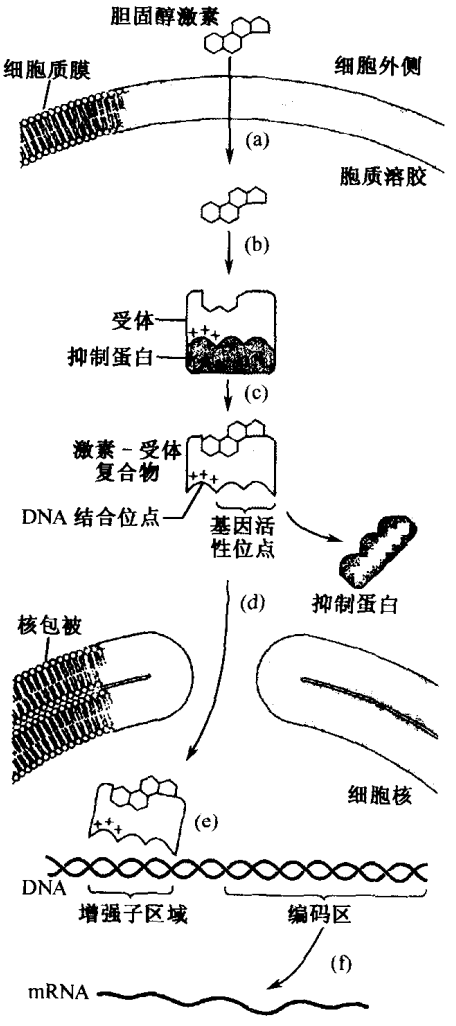


图 5-9　糖皮质激素受体激活
（引自 Becker *et al*., 1996）
(a) 类固醇激素通过扩散穿过细胞质膜；(b) 激素分子与胞质溶胶中的受体结合；(c) 抑制蛋白与受体脱离，露出与 DNA 结合和激活基因转录的位点；(d) 被激活的复合物进入细胞核；(e) 与 DNA 增强子区结合；(f) 促进受激素调节的基因转录。

了解主要是通过对糖皮质激素（glucocorticoid）与其受体的功能研究。在缺少糖皮质激素时，糖皮质激素受体存在于胞质溶胶中，并与一个胞质溶胶蛋白结合在一起。与受体结合的抑制蛋白起着阻止受体进入到细胞核与相应基因的顺式作用元件结合的作用。因此，在没有糖皮质激素时，糖皮质激素受体处于被抑制状态，因而没有活性。糖皮质激素与受体的结合，可将受体从受抑制状态解放出来，并使糖皮质激素受体进入到细胞核，在那里与特异基因上游的转录调控序列结合并促进基因的转录（图 5-9）。糖皮质激素调节受体的作用为研究类固醇激素是如何调节基因转录提供了一个模式。但是，大多数类固醇激素受体即使在缺乏激素时就已经位于细胞核中，此时的类固醇激素受体仍不能促进基因的转录，其原因可能是类固醇激素受体被细胞核中的抑制蛋白所抑制。

5.1.3.2 3 类细胞表面受体的基本特性

由于大多数信号分子是亲水的蛋白质、多肽或其他一些水溶性的分子，这些分子不能穿过细胞质膜，所以它们在靶细胞上的受体就位于细胞质膜上。

表面受体主要有 3 种类型：离子通道偶联受体（ion-channel linked receptor）、G 蛋白偶联受体（G-protein linked receptor）、酶联受体（enzyme-linked receptor）（图 5-10）。大多数表面受体都属于这 3 种受体中的一种。这些受体所接受的信号是不同的，所产生的信号也是不同的。

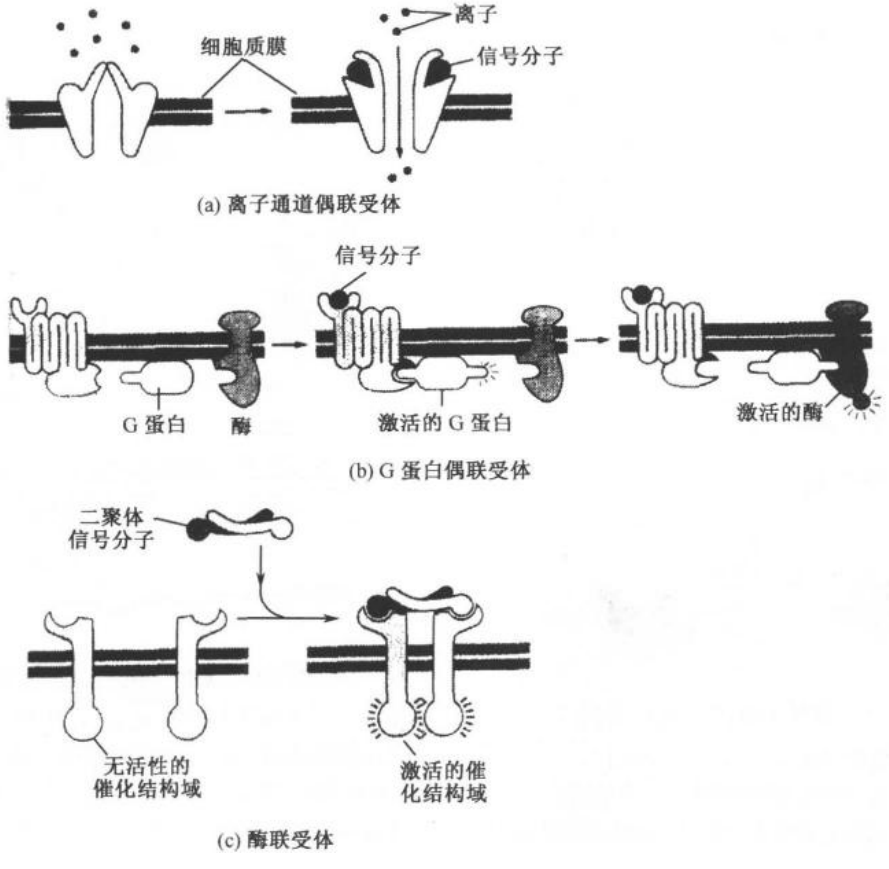


图 5-10 3 种类型的细胞表面受体（引自 Alberts *et al*., 1998）

离子通道偶联受体

具有离子通道作用的细胞质膜受体称为离子通道受体。这种受体见于可兴奋细胞间的突触信号传导，产生一种电效应，如烟碱样乙酰胆碱受体（nicotinic acetylcholine receptor，nAchR）、γ-氨基丁酸受体（γ-aminobutgric acid receptor，GABAR）和甘氨酸受体等都是离子通道偶联受体。它们多为数个亚基组成的寡聚体蛋白，除有配体结合位点外，本身就是离子通道的一部分，并借此将信号传递至细胞内。信号分子同离子通道受体结合，可改变膜的离子通透性。神经递质乙酰胆碱具有很多功能，如触发肌细胞的收缩、降低心跳、将神经信号从一个细胞传向另一个细胞等。乙酰胆碱之所以具有多种功能，是因为它能同多种类型的离子通道受体结合，引起不同的反应。

图 5-11 说明离子通道偶联受体的工作原理。当激活的电动势到达神经轴的末端时，刺激神经递质从膜运输小泡释放到突触空间。释放出来的神经递质扩散穿过突触并同相邻肌细胞

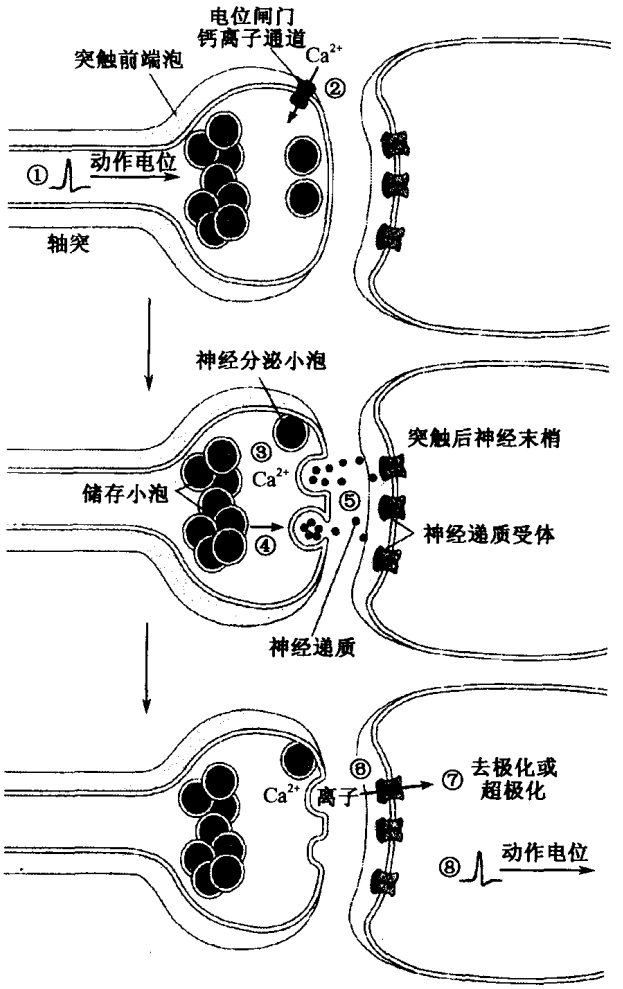


图 5-11 离子通道偶联受体与信号转导（引自 Becker *et al.*, 1996）

①动作电位到达突触末端，引起暂时性的去极化；②去极化作用打开了电位闸门钙离子通道，导致钙离子进入突触球；③Ca^{2+}浓度提高诱导分离的含神经递质分泌泡的分泌，释放神经递质；④Ca^{2+}引起储存小泡分泌释放神经递质；⑤分泌的神经递质分子经扩散到达突触后细胞的表面受体；⑥神经递质与受体的结合，改变受体的性质；⑦离子通道开放，离子得以进入突触后细胞；⑧突触后细胞中产生动作电位。

质膜受体结合。这种结合触发引起肌细胞膜通透性快速而又短暂的提高。

烟碱样乙酰胆碱受体是研究得比较清楚的离子通道偶联受体，它存在于脊椎动物骨骼肌细胞以及某些鱼的放电器官细胞的质膜上；受体与乙酰胆碱结合，引起 Na^+ 通道的开放，Na^+ 流入靶细胞，使得质膜去极化并引起细胞的收缩。

乙酰胆碱是如何同受体结合并引起对 Na^+ 通透性的增加？为了回答这个问题，首先必须纯化受体并研究它的离体功能，由于发现了一种蛇毒毒素，使得受体的纯化成为可能。

α 银环蛇毒素（α-bungarotoxin）是一种小分子的蛋白质，能够选择性地并且几乎是不可逆地同乙酰胆碱受体结合。这些毒素能够阻止乙酰胆碱同受体相互作用，导致呼吸麻痹和死亡。利用放射性标记的 α 银环蛇毒素可在显微镜下确定组织切片中的乙酰胆碱受体的位置以及检查纯化的蛋白样品中是否有受体的存在。利用 α-银环蛇毒素从电鳐属电辐射鱼的放电器官细胞质膜中分离纯化了乙酰胆碱受体。结构分析发现这种受体是由 5 个亚基组成的，其中两个 α 亚基、一个 β 亚基、一个 γ 亚基、一个 δ 亚基，最小的亚基 α 上有乙酰胆碱的结合位点（图 5-12）。

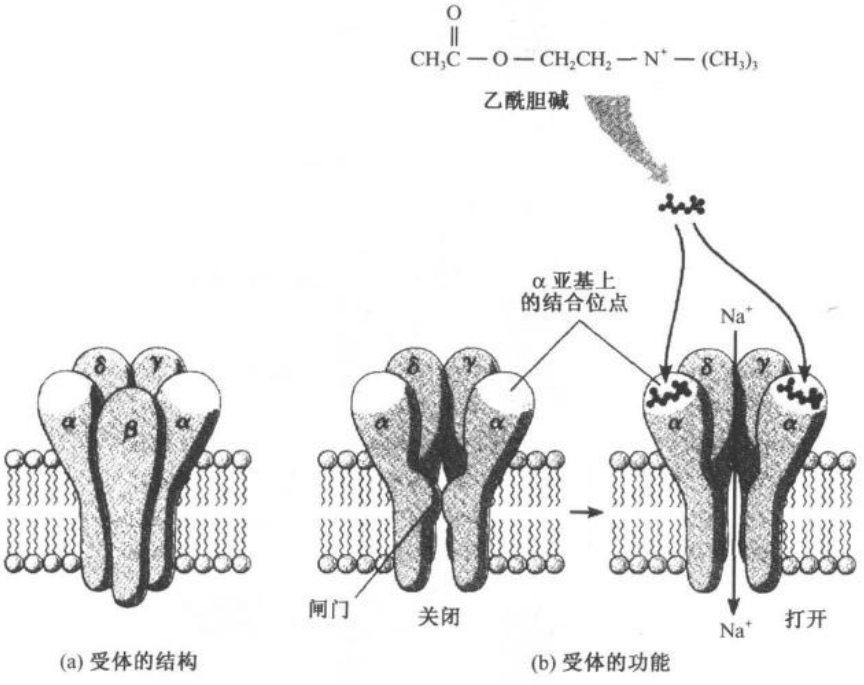


图 5-12　乙酰胆碱离子通道偶联受体的结构域功能（引自 Becker *et al*., 1996）

一旦乙酰胆碱受体被分离纯化，就有可能研究它的作用机制。但要解决的问题是，乙酰胆碱受体本身就是离子通道还是因乙酰胆碱同受体结合后，使受体成为离子通道。最直接的证据是通过脂质体研究出来的。将纯化的烟碱样乙酰胆碱受体加到脂质体上，Na^+ 的通透性就增加了，由于人工脂质体上没有其他的蛋白成分，根据这一实验推测烟碱样乙酰胆碱受体本身就是一种 Na^+ 离子通道，也说明乙酰胆碱受体是神经递质门控离子通道。通道的开启与关闭受神经递质乙酰胆碱的调节。

G 蛋白偶联受体

G 蛋白偶联受体是最大的一类细胞表面受体，它们介导许多细胞外信号的转导，包括激素、局部介质和神经递质。配体与受体结合后激活相邻的 G 蛋白，被激活的 G 蛋白又可激活或抑制一种产生特异第二信使的酶、或离子通道，引起膜电位的变化。由于这种受体参与的信号转导作用要与 GTP 结合的调节蛋白相偶联，因此将它称为 G 蛋白偶联受体。

这类受体的种类很多，在结构上都很相似：都是一条多肽链，并且有 7 次 α 螺旋跨膜区（图 5-13）。这种 7 次跨膜受体蛋白的超家族包括视紫红质（脊椎动物眼中的光激活光受体蛋白）以及脊椎动物鼻中的嗅觉受体。

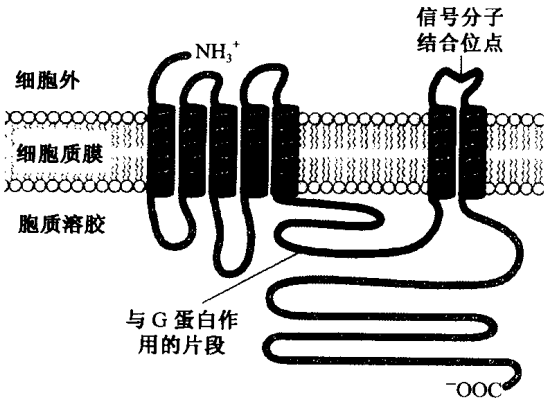


图 5-13　G 蛋白偶联受体的结构
（引自 Becker *et al*., 1996）
每一种 G 蛋白偶联受体都有 7 个 α 螺旋的跨膜区，信号分子与受体的细胞外部分结合，并引起受体的细胞内部分激活相邻的 G 蛋白。

G 蛋白偶联受体的进化地位相当原始，不仅存在于亲缘关系较远的真核生物（如酵母）中，即使在细菌中也存在与 G 蛋白偶联受体相似的膜蛋白，如细菌的菌紫红质，它的作用是光驱动的 H^+ 泵。但细菌中的此类蛋白并不具有 G 蛋白偶联受体的功能，因为细菌中没有 G 蛋白，推测其偶联系统并不相同。

酶联受体

这种受体蛋白既是受体又是酶，一旦被配体激活即具有酶活性并将信号放大，又称催化受体（catalytic receptor）。这一类受体转导的信号通常与细胞的生长、繁殖、分化、生存有关。酶联受体也是跨膜蛋白，但是它的细胞内结构域常常具有某种酶的活性，故称为酶联受体。并非所有的酶联受体的细胞内结构域都具有酶活性，所以，根据受体的细胞内结构域是否具有酶活性将此类受体分为两大类：酪氨酸激酶偶联受体和内源酶促活性受体。

酪氨酸激酶偶联受体（tyrosine kinase-linked receptor）是缺少细胞内催化活性的酶联受体，受体与酪氨酸蛋白激酶是两种不同的蛋白，与此类受体结合的信号分子有促红细胞生成素、干扰素等。此类受体的细胞内结构域虽然没有催化活性，但仍同酶直接相关。配体与受体结合，使两个受体单体形成二聚体。然后每一个受体单体结合一个酪氨酸蛋白激酶，并将之激活。虽然这种受体本身没有酶的结构域，但实际效果与具有酶结构域的受体是一样的（图 5-14）。

内源酶促活性受体（receptor with intrinsic enzymatic activity）有很多种类型：某些配体与受体结合激活受体细胞内结构域中的鸟苷酸环化酶的活性，或是磷酸酶的活性［图 5-15 (a)、(b)］，此类受体通常以单体起作用。胰岛素和生长因子受体同配体结合后触发蛋白激酶的活性。在多数情况下，受体与配体结合后，受体会形成二聚体，并激发丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶活性或酪氨酸蛋白激酶的活性［图 5-15 (c)、(d)］。习惯上将这些受体称为受体丝氨酸/苏氨酸激酶（receptor serine /threonine kinase）和受体酪氨酸激酶（receptor tyrosine kinase,

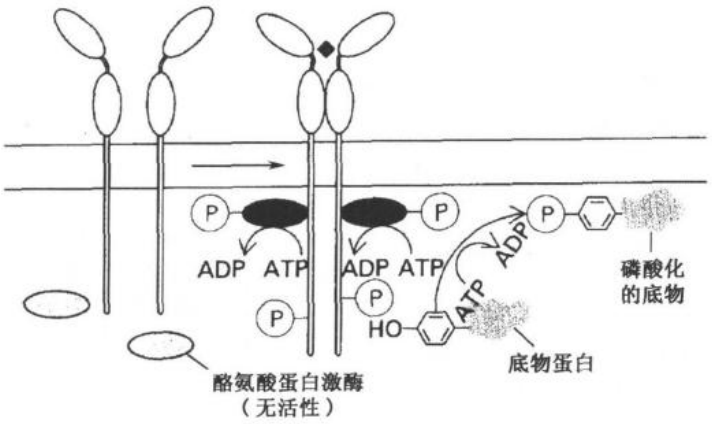


图 5-14　酪氨酸蛋白激酶偶联受体（引自 Lodish *et al*., 1995）
受体与酪氨酸蛋白激酶是分开的，配体与受体结合后，受体形成二聚体，两个酪氨酸蛋白激酶分别与受体结合并被激活。

RTK)。它们的作用是将受体细胞内结构域进行自身磷酸化。RTK 的自我磷酸化能够产生几个与细胞质酶结合的位点，从而将这些酶集中到质膜旁的底物处，在某些情况下，也能产生第二信使。此外，RTK 能够磷酸化多种底物蛋白，并改变它们的活性。

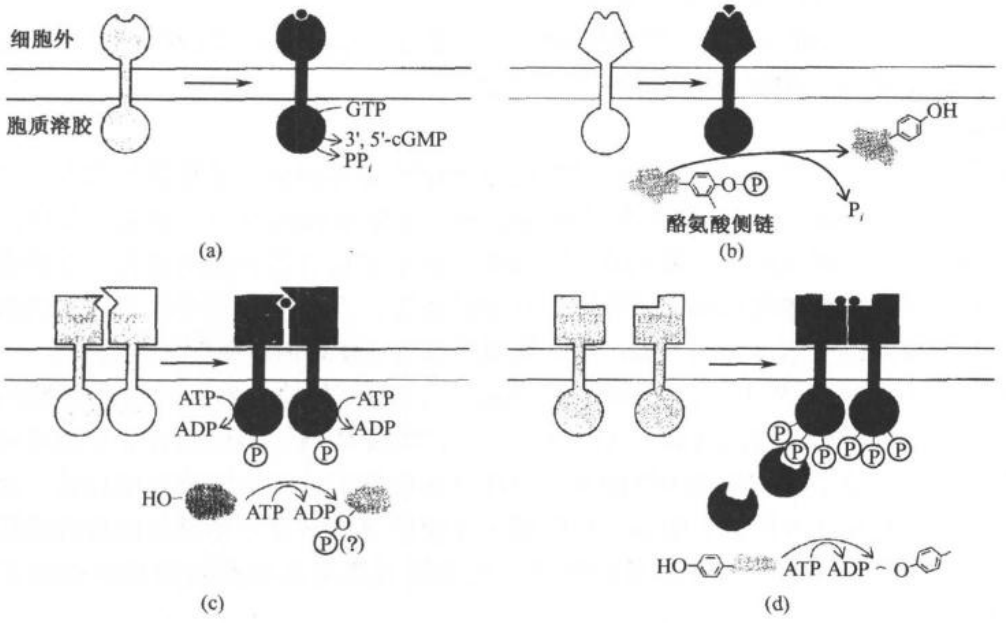


图 5-15　具有细胞内催化结构域的酶联受体（引自 Lodish *et al*., 1995）
(a) 鸟苷环化酶受体（配体：心钠素 β）；(b) 受体酪氨酸磷酸酶（配体：白细胞 CD45 蛋白）；(c) 受体丝氨酸/苏氨酸激酶（配体：转化生长因子 β）；(d) 受体酪氨酸激酶(配体:胰岛素,表皮生长因子等)。

5.1.3.3　表面受体超家族

根据表面受体进行信号转导的方式将受体分为 3 大类，若是根据表面受体与质膜的结合

方式则可分为单次跨膜、7次跨膜和多亚单位跨膜等3个家族（图5-16）。

酪氨酸蛋白激酶受体和鸟苷酸环化酶受体等都属于单次跨膜受体（single-pass receptor），它们的多肽链上只有一个跨膜的α螺旋。第二类是7次跨膜受体（seven-pass receptor），这类受体的多肽链中有7个跨膜α螺旋区，如肾上腺素受体、多巴胺受体、5-羟色胺受体、促甲状腺素受体、黄体生成素受体等都是7次跨膜受体，此类受体在信号转导中全部同G蛋白偶联。第三类是由多个亚基共同组装成的多亚基受体（multisubunit receptor），如前面讨论过的烟碱样乙酰胆碱受体。受体与膜结合方式的差异决定着它们参与细胞通讯方式的不同。

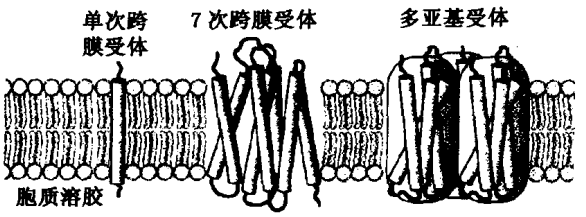


图5-16 跨膜的表面受体
（引自 Kleinsmith *et al.*，1995）

5.1.4 受体与配体相互作用及研究方法

细胞通过化学信息进行通讯的能力取决于信号分子的合成与分泌以及受体与配体的相互识别和结合，配体与受体的结合又与配体与受体的结构和化学性质相关联。

5.1.4.1 受体与配体相互作用特性

多细胞生物体中的细胞，其周围环境中常常有多达几百种的化学信号分子，细胞如何去识别？是否一种信号分子只能作用于一种类型的细胞？受体与配体如何结合？这些都是由受体自身的特性决定的。

特异性（specificity） 受体与配体的结合是高度特异性的反应，就如同酶与底物特异性识别。所以，受体与配体的结合是选择性的，不受其他信号分子的干扰。不过，这种特异性不是绝对的，如胰岛素受体除结合胰岛素外，还可同胰岛素样生长因子结合；糖皮质（激）素受体除同糖皮质（激）素结合以外，还可同其他甾类激素结合，反之亦然。这种受体与配体交叉结合的现象称为受体交叉（receptor crossover）。

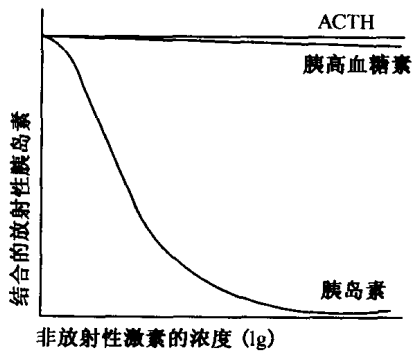


图5-17 证明激素与受体结合特异性的实验
（引自 Kleinsmith *et al.*，1995）

为了研究受体与配体结合的特异性，可采用非放射性标记的底物同放射性标记的配体竞争受体结合位点的方法，如果结合具特异性，只有信号分子能够同受体结合，而与信号分子无关的分子则不能同受体结合。例如，放射性标记的胰岛素与受体的结合不会受胰高血糖素或促肾上腺皮质激素（ACTH）的抑制，但是能够被非放射性标记的胰岛素或胰岛素衍生物所抑制（图5-17）。

实验中，将放射性标记的胰岛素与分离的细胞质膜一起温育，同时加入各种不同浓度的胰高血糖素或ACTH。与胰岛素无关的激素不会与放射性标记的胰

岛素竞争质膜受体。

高亲和力（high affinity）　受体与配体结合的能力称为亲和力。通过配体与受体结合反应的动力学分析可获得亲和力的信息。受体对其配体的亲和力很强，亲和力越强，受体越容易被占据。亲和力的大小常用受体-配体复合物的解离常数（K_d）值来表示，通常在 10^{-9} mol·L^{-1}左右。

饱和性（saturation）　由于细胞含有有限数量受体分子，提高配体分子的浓度，可使细胞的受体全部被配体所占据，此时的受体处于饱和状态，即使增加配体的浓度也不会增加配体与受体的结合。由于一个细胞或一定组织内受体的数目是有限的，因此受体与配体的结合具有饱和性。

可逆性（reversibility）　由于配体与受体的结合是通过非共价键，所以是快速可逆的，当引发出生物效应后，受体-配体复合物解离，受体可以恢复到原来的状态，并再次使用。受体与配体结合的可逆性有利于信号的快速解除，避免受体一直处于激活状态。

生理效应（physiological response）　信号分子与受体的结合会引起适当的生理反应，反应的强弱与结合配体的受体数量正相关。如在胰岛素与受体结合时，会激发葡萄糖向靶细胞的运输，并且，葡萄糖运输的数量随受体结合胰岛素的数量增加而增加。

5.1.4.2　信号分子与受体相互作用的复杂性

在多细胞的生物体中，一个细胞的周围通常有上百种不同的信号分子，这些信号分子中有些游离存在于细胞外液中，有些则是附着在细胞外基质，还有一些是结合在相邻细胞的表面。细胞必须对这些信号分子做出选择性的反应，根据细胞自身的特异性有所为和有所不为。

细胞同信号分子的反应首先取决于细胞是否具有某种信号分子的受体，如果没有受体，细胞对信号就会视而不见，因此不会有什么反应。尽管细胞通过产生有限的受体来限制自己对众多的细胞信号分子作出反应，但是信号分子仍能以相当复杂的方式来控制细胞的行为。这种复杂性分表现在两个方面。

第一，虽然一种信号分子只能同一种受体作用，但是却能作用于不同的靶细胞产生多种

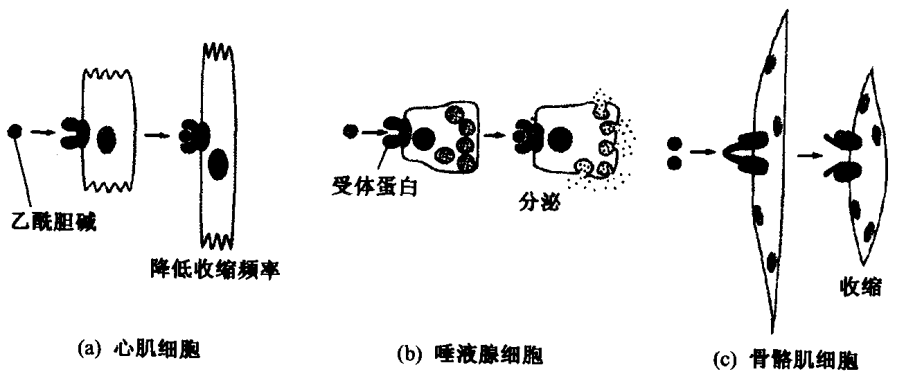


图 5-18　相同的信号分子在不同的靶细胞中引起不同的应答（引自 Alberts *et al.*, 1998）
不同类型的细胞以不同的方式对神经递质乙酰胆碱做出应答。在（a）和（b）中，信号分子与相同的受体蛋白结合，但由于细胞的功能不同，引起不同的反应；在（c）中乙酰胆碱作用于不同的受体。

效应：如形态变化、运动性改变、代谢改变以及基因表达的变化。相同的信号分子能以不同的方式引起不同细胞的反应，如当心肌细胞暴露于神经递质乙酰胆碱中时，它降低了收缩的频率；但是当唾液腺暴露于相同的信号分子中时，却能分泌唾液（图 5-18）。

第二，一个细胞表面有几十甚至上千种不同的受体同时与细胞外基质中的不同信号分子起作用，这些信号分子共同作用的影响比任何单个信号所起的作用都强得多。所以，细胞必须对多种信号进行协调综合。由于不同信号分子间的不同组合，会使细胞产生不同的综合性反应，有些信号组合起来可促进使细胞分裂，有些则促使细胞死亡。

5.1.4.3 亲和标记法分离表面受体

细胞表面受体分离纯化的方法有单克隆抗体标记法、亲和标记法等。亲和标记（affinity labeling）的原理是：将细胞与超量标记的激素（配体）混合，以饱和所有特异受体的激素结合位点。洗去多余的激素，然后加入能够与受体和配体结合的共价交联剂将激素与受体进行共价交联（图 5-19）。

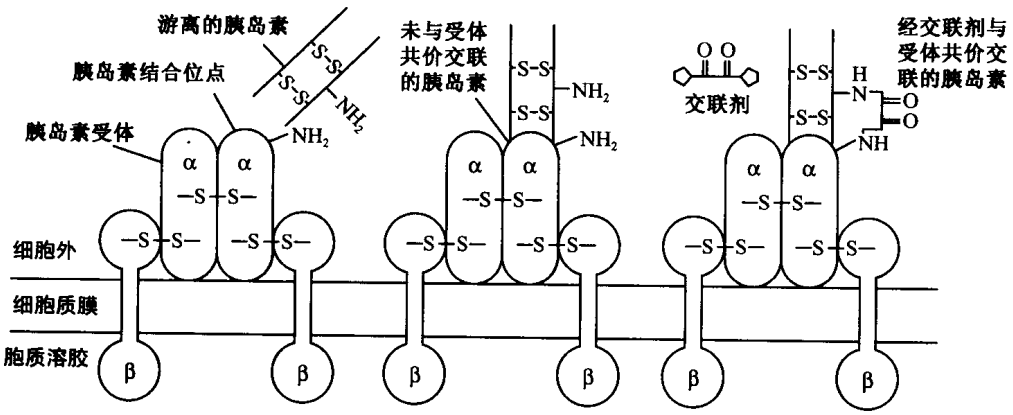


图 5-19 亲和标记胰岛素受体（引自 Lodish *et al*., 1995）

四聚体的受体含有 2 个与胰岛素结合的 α 亚基、2 个跨膜的 β 亚基，这 4 个亚基之间都是通过二硫键结合起来的。当胰岛素与受体结合时，激素和受体蛋白上的 2 个自由氨基被带到一起，能被 1 个交联分子共价结合。如果胰岛素是放射性标记的，用除垢剂溶解质膜，通过放射性分析很容易检测到受体。

大多数交联剂（cross-linking agent）含有两个可与蛋白质中自由氨基相互作用的基团（图 5-20），当表面受体与配体结合后，配体和受体上各自的自由氨基的距离靠近到足以被小分子的交联剂结合时，受体和配体就会被交联在一起。又由于与交联剂共价结合的配体和受体能够耐受去垢剂和变性剂的处理，也就是说，在有去垢剂和变性剂存在时，它们依然交联在一起，因而可用去垢剂和变性剂溶解细胞质膜，分离膜蛋白进行分析。

如果实验中所用的胰岛素是放射性标记的，将膜蛋白溶解之后进行电泳，然后通过放射自显影进行分析。因为胰岛素仍与特异的表面受体结合在一起，分子质量大，电泳时在凝胶上迁移的速度比没有与受体结合的胰岛素慢，移动的距离短。

通过上述方法只能检测是否有表面受体的存在，如果需要纯化表面受体，可用前面介绍过的亲和层析法，因为与配体结合在一起的受体在亲和层析时仍保持与配体的结合能力。在

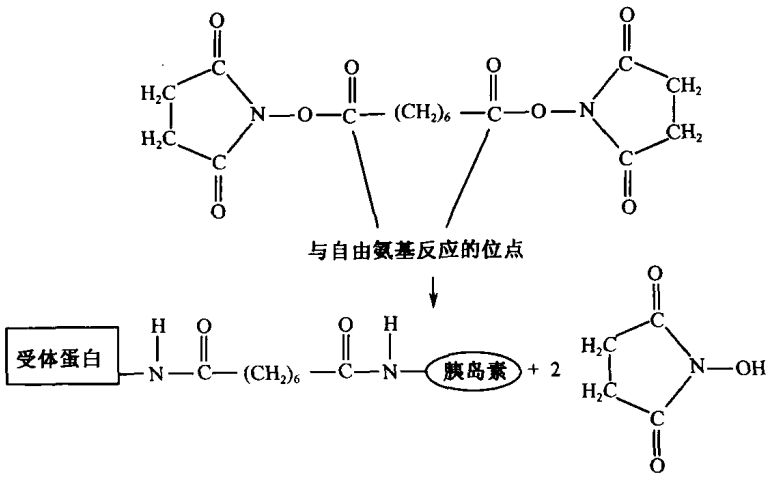


图 5-20　交联剂的分子结构及与受体和配体的共价交联

亲和层析纯化表面受体时，将溶解的膜蛋白通过一种层析柱，柱中的介质能够与配体结合，因此，与配体结合的表面受体也就被结合在层析柱中，然后用大量的配体洗柱将结合的配体连同受体一起洗脱。

5.1.5　信号转导与第二信使

信号分子这把钥匙一旦打开了细胞表面的受体锁，细胞就要做出应答。由于细胞自身就是一个社会，有各种不同的结构和功能体系，外来信号应由何种功能体系应答？这就是所谓的信号转导的通路。

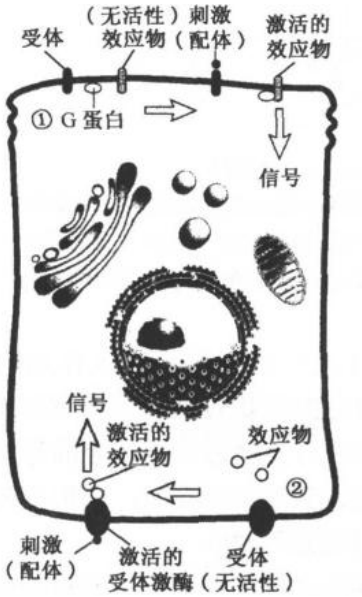


图 5-21　信号转导的两种途径（引自 Karp，1996）

途径①，结合的配体激活 G 蛋白，然后由 G蛋白激活效应物产生信号；途径②中，结合配体激活受体的酶活性，然后由激活的受体酶激活产生信号的效应物。

5.1.5.1　信号转导途径

已经讨论了细胞通讯的一些基本特点，但主要是信号传导和接收，大多数信号分子是水溶性的，只能通过表面受体传递信息。表面受体通过一定的机制将外部信号转为内部信号，称为信号转导。并非所有的外部信号都需要进行转导的，如一些脂溶性的信号分子直接进入细胞作用于受体，并与受体一起作为转录促进因子启动基因的表达。

细胞有两种信号转导途径，一种是通过 G 蛋白偶联方式，即信号分子同表面受体结合后激活 G 蛋白，再由 G 蛋白激活效应物，效应物产生细胞内信号；第二种转导途径是结合的配体激活受体的酶活性，然后由激活的酶去激活产生细胞内信号的效应物（图 5-21）。

虽然细胞对信号转导只有两种途径，但是细胞内有

各种不同的生化反应途径，当外部信号被转换成内部信号后，在细胞内的传递途径如何，即引起细胞内何种类型的反应又是一个相当复杂的问题。细胞内各种不同的生化反应途径都是由一系列不同的蛋白和酶组成的，执行着不同的生理生化功能。各途径中上游蛋白对下游蛋白活性的调节（激活或抑制）主要是通过添加或去除磷酸基团，从而改变下游蛋白的构型完成的（图 5-22）。所以，构成生化反应途径的主要成员是蛋白激酶和磷酸酶，它们能够引起细胞活性的快速变化又迅速恢复。有些蛋白激酶和磷酸酶是可溶性细胞质蛋白，有些则是膜整合蛋白。有些酶可作用于多种蛋白底物，而有些只能作用于一种。在酶作用的蛋白底物中，有些本身就是酶，可作用于其他的底物。在信号转导途径中的酶作用底物，除了酶蛋白外，也包括离子通道、转录因子以及各种类型的调节亚基。

由此看来，信号转导途径有两个层次，第一是将外部信号转换成内部信号途径。第二层次的含义是外部信号转换成内部信号后从哪个途径引起应答，图 5-22 所示的例子最终是通过基因转录产生应答反应。

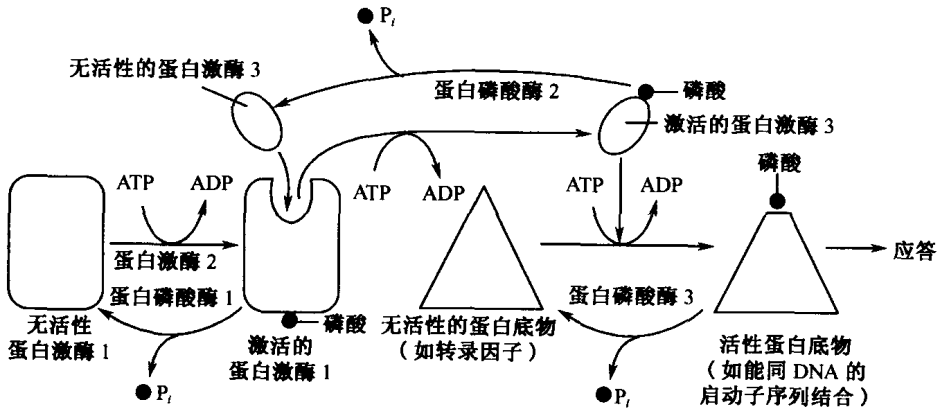


图 5-22　由蛋白激酶和蛋白磷酸酶构成的信号转导途径（引自 Karp, 1996）

图中的蛋白激酶 1 被蛋白激酶 2 磷酸化而激活，激活的蛋白激酶 1 使蛋白激酶 3 磷酸化而激活，蛋白激酶 3 磷酸化转录因子，增强转录因子与 DNA 结合的亲和力，对信号产生应答。途径中的每一个激活过程都可通过去磷酸化逆转。

5.1.5.2　细胞应答与信号级联放大

从上面讨论的例子看，似乎细胞对信号的反应仅是单一基因表达的启动，其实不然。一般细胞对外部信号的反应通常是综合性反应，包括基因表达的变化、酶活性的变化、细胞骨架构型的变化、通透性的变化、DNA 合成的变化、细胞死亡程序的变化等（图 5-23）。当然，这些变化并非都是由一种信号引起的，通常要几种信号结合起来才能产生较复杂的反应，而且通过信号的不同组合产生不同的反应。

另外，从反应的速度看，有些反应相当快，有些则十分缓慢，需要几分钟到几小时。例如，激活的蛋白激酶 A 对一些参与糖原分解酶的磷酸化在几秒钟之内即可完成。如果细胞对信号的反应涉及基因，就相当慢，因为信号要通过受体和第二信使并传递到细胞核才能启动基因的表达，而且基因的启动要涉及若干不同的反式作用因子和顺式作用元件的相互作用。

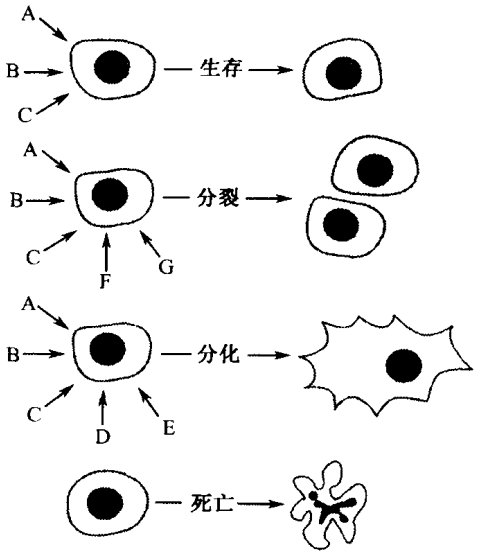


图 5-23　多种细胞外信号引起动物细胞的应答
（引自 Alberts *et al*., 1998）
细胞在信号应答中的每一种最终表现都是受体接受了一套相关的细胞外信号并做出综合应答的结果。图中所示只是推测的简化模式。

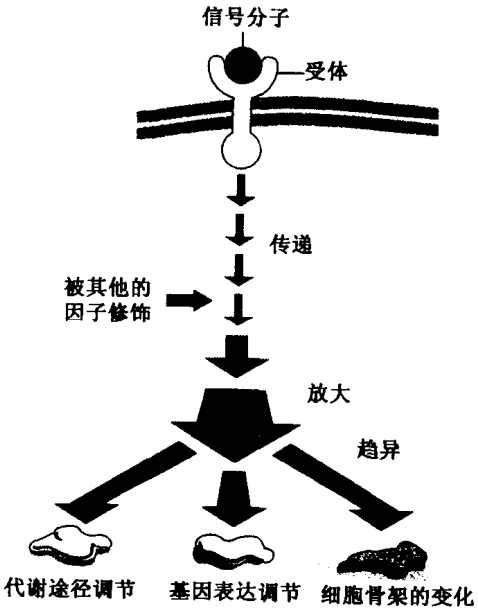


图 5-25　细胞内的信号级联放大作用
（引自 Alberts *et al*., 1998）
细胞表面受体蛋白将细胞外信号转变为细胞内信号，经信号级联放大、分散和调节产生综合性的细胞应答。

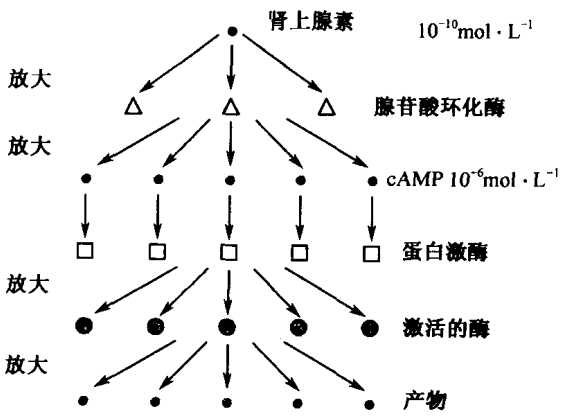


图 5-24　肾上腺素在细胞内的级联放大作用

从细胞表面受体接收外部信号到最后做出综合性应答，不仅是一个信号转导过程，更重要的是将信号进行逐步放大，称为信号级联放大（signaling cascade）或级联反应。

组成级联反应的各个成员称为一个级联（cascade），主要是由磷酸化和去磷酸化的酶组成。信号的级联放大作用对细胞来说至少有两个优越性：第一，同一级中所有具有催化活性的酶受同一分子调控，如糖原分解级联中有 3 种酶：依赖于 cAMP 的蛋白激酶、糖原磷酸化酶激酶和糖原磷酸化酶都是直接或间接受 cAMP 调控的。第二，通过级联放大作用，使引起同一级联反应的信号得到最大限度的放大。如 10^{-10}mol·L^{-1}的肾上腺素能够通过对糖原分解的刺激将血液中的葡萄糖水平提高 50%。在肾上腺素的刺激下，细胞内产生 10^{-6} mol·L^{-1}的 cAMP（图 5-24）。

级联反应除了具有将信号放大，使原始信号变得更强、更具激发作用，引起细胞的强烈反应外，级联反应还有其他一些作用：①信号转移，即将原始信号转移到细胞的其他部位；②信号转化，即将信号转化成能够激发细胞应答的分子，如级联中的酶的磷酸化；③信号的趋异，即将信号分开为几种平行的信号，影响多种生化途径，引起更大的反应。级联反应途中的各个步骤都有可能受到一些因子的调节，因此级联反应的最终

效应还是由细胞内外的条件决定（图 5-25）。

5.1.5.3 第二信使

细胞可通过两个途径将细胞外的激素类信号转换成细胞内信号，然后通过级联放大作用，引起细胞的应答。这种由细胞表面受体转换而来的细胞内信号通常称为第二信使（second messenger），而将细胞外的信号称为第一信使（first messenger）（图 5-26）。

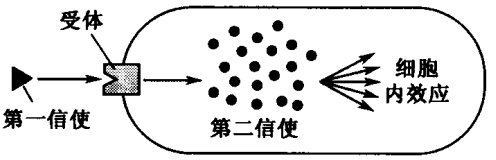


图 5-26 第二信使的产生及作用

各种激素、神经递质、局部介质作为第一信使与细胞质膜的表面受体结合，并触发细胞内形成传递信息的第二信使，在细胞内传递信息。

第二信使至少有两个基本特性：①是第一信使同其膜受体结合后最早在细胞膜内侧或胞浆中出现的仅在细胞内部起作用的信号分子；②能启动或调节细胞内稍晚出现的信号应答。

第二信使都是小的分子或离子。细胞内有 5 种最重要的第二信使：cAMP、cGMP、二酰甘油（diacylglycerol，DAG）、肌醇三磷酸（inososito trisphosphate，IP_3）、Ca^{2+}等（图 5-27）。

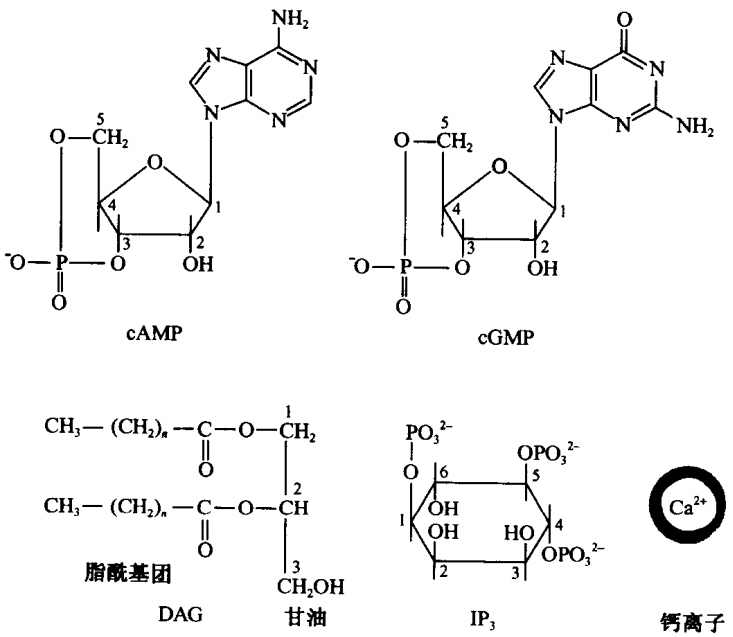


图 5-27 细胞内 5 种第二信使的结构

第二信使在细胞信号转导中起重要作用，它们能够激活级联系统中酶的活性以及非酶蛋白的活性。第二信使在细胞内的浓度受第一信使的调节，它可以瞬间升高、且能快速降低，并由此调节细胞内代谢系统的酶活性，控制细胞的生命活动，包括：葡萄糖的摄取和利用、脂肪的储存和移动以及细胞产物的分泌。第二信使也控制着细胞的增殖、分化和生存，并参与基因转录的调节。

5.2 G蛋白偶联受体及信号转导

细胞质膜上最多，也是最重要的信号转导系统是由G蛋白介导。这种信号转导系统有两个重要的特点：①系统由3个部分组成：7次跨膜的受体、G蛋白和效应物(酶)；②产生第二信使。

5.2.1 G蛋白的结构与功能

G蛋白，即GTP结合蛋白（GTP binding protein），它能与GTP或GDP结合，故此得名，又叫鸟苷酸结合调节蛋白（guanine nucleotide-binding regulatory protein)。从组成上看，有单体G蛋白（一条多肽链）和多亚基G蛋白（多条多肽链组成)。G蛋白参与细胞的多种生命活动，如细胞通讯、核糖体与内质网的结合、小泡运输、微管组装、蛋白质合成等。

5.2.1.1 异源三体G蛋白的结构组成

G蛋白偶联系统中的G蛋白是由3个不同亚基组成的异源三体G蛋白（heterotrimeric G-protein)，3个亚基分别是α、β、γ，总分子质量在100kDa左右，β亚基为36kDa左右，γ亚基为8～11kDa。β、γ亚基通常紧密结合在一起，只有在蛋白变性时才分开，鸟苷结合位点位于α亚基上。此外，α亚基还具有GTPase的活性结构域和ADP核糖化位点。G蛋白属外周蛋白，它们在膜的细胞质面通过脂肪酸链锚定在质膜上。G蛋白是一个大家族，目前研究得较多的是G_s（转导激素对腺苷酸环化酶的活化过程)、G_i（转导激素对腺苷酸环化酶的抑制作用)，另外还有其他的一些三体G蛋白。G蛋白有多种调节功能，包括G_s和G_i对腺苷酸环化酶的激活和抑制、对cGMP磷酸二酯酶的活性调节、对磷脂酶C的调节、对细胞内Ca^{2+}浓度的调节等。此外还参与闸门离子通道的调节（表5-4)。

表5-4 异源三体G蛋白介导的生理反应

刺激物	受体	效应物	生理反应
肾上腺素	β-肾上腺素能受体	腺苷酸环化酶	糖原分解
光	视紫红质	cGMP磷酸二酯酶	视觉激发
IgE-抗原复合物	肥大细胞IgE受体	磷脂酶C	分泌
f-Met肽	趋化受体	磷脂酶C	趋化性
乙酰胆碱	毒蕈碱性受体	K^+通道	起搏活性降低

5.2.1.2 G蛋白循环

G蛋白在G蛋白偶联信号转导系统中所起的作用相当于一个功能开关，因为G蛋白能够以两种不同的状态结合在细胞质膜上。一种是静息状态，即三体状态，此时的α亚基上结合的是GDP。另一种是活性状态，此时的α亚基上结合的是GTP，并且α亚基已与β、γ亚基分开，而同某一特异蛋白结合在一起，引起信号转导。如果GTP被水解成GDP，则G蛋白又恢复成三体的静息状态，因为此时在α亚基上结合的是GDP而非GTP。G蛋白由非活性状态转变成活性状态，尔后又恢复到非活性状态的过程称为G蛋白循环（G-protein cycle)（图5-28)。

G 蛋白的这种活性转变与以下 3 种蛋白相关联。

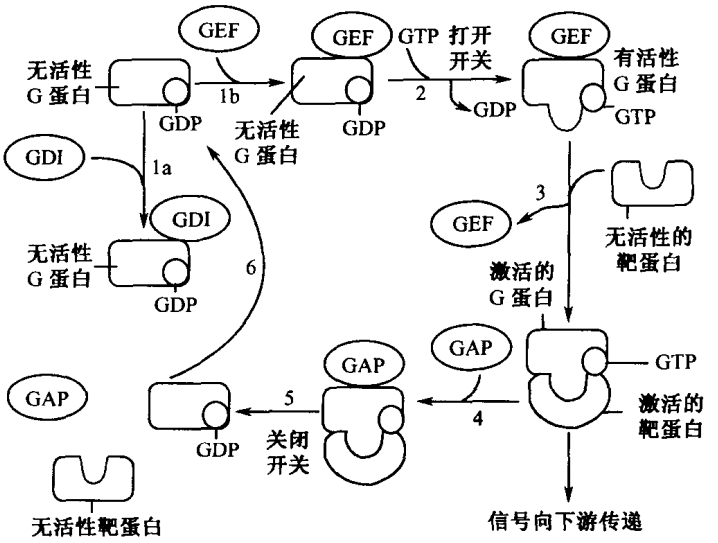


图 5-28 G 蛋白循环（引自 Karp, 1999）

G 蛋白与 GDP 结合时是非活性状态，如果无活性的 G 蛋白与 GDI 结合，则处于被抑制状态（无活性），如果 G 蛋白与 GEF 相互作用，将 GDP 换成了 GTP，G 蛋白则被激活，可启动下游反应。处于活性状态的 G 蛋白与 GTPase 激活蛋白（GAP）相互作用，会激活 GTPase，使 GTP 水解成 GDP，此时的 G 蛋白又恢复到无活性状态。

GTPase 激活蛋白（GTPase-activating protein，GAP） 大多数 G 蛋白具有催化所结合的 GTP 水解的能力，但是这种能力在与 GAP 相互作用时会大大提高，由于 GAP 的作用加速了 GTP 的水解，因而 GAP 能够缩短 G 蛋白介导应答的时间。

鸟苷交换因子（guanine nucleotide-exchange factor，GEF） 与失活 G 蛋白结合的 GDP 被 GTP 替换后，G 蛋白就会转变成活性状态。GEF 是促进 GDP 从 G 蛋白上解离的蛋白因子，一旦 GDP 被释放，G 蛋白很快就会与 GTP 结合，因为细胞中的 GTP 的浓度很高，所以 GEF 能够激活 G 蛋白。

鸟苷解离抑制蛋白（guanine nucleotide-dissociation inhibitor，GDI） GDI 的作用是抑制结合的 GDP 从 G 蛋白释放出来，所以 GDI 可保持 G 蛋白处于非活性状态。

5.2.1.3 G 蛋白在信号转导中的作用

某些 G 蛋白可直接控制离子通道的通透性，一个典型的例子是通过神经递质乙酰胆碱调节心肌收缩。心肌细胞含有很多毒蝇碱性乙酰胆碱受体（muscarinic acetylcholine receptor），乙酰胆碱与毒蝇碱性乙酰胆碱受体结合，通过引起 K^+ 离子通道的开放来降低心跳。由于细胞内 K^+ 浓度比细胞外高，K^+ 从细胞内扩散出来，使得质膜超极化（hyperpolarization）。这一发现是通过膜片钳（patch clamp）技术研究出来的。在控制的条件下，第二信使（如 cAMP）形成极少，将纯化的 G 蛋白加入到膜片中会激发 K^+ 离子通道打开，K^+ 离子通道也可被纯化的 G 蛋白的 α 亚基打开，但是不能被 β 和 γ 亚基打开。这些发现说明乙酰胆碱与毒蝇碱性乙酰胆碱受体结合激活了 G 蛋白，而激活的 G 蛋白 α 亚基可将 K^+ 离子通道打开。后来的研究发现：G 蛋白的 βγ 亚基复合物也能打开 K^+ 离子通道（图 5-29）。

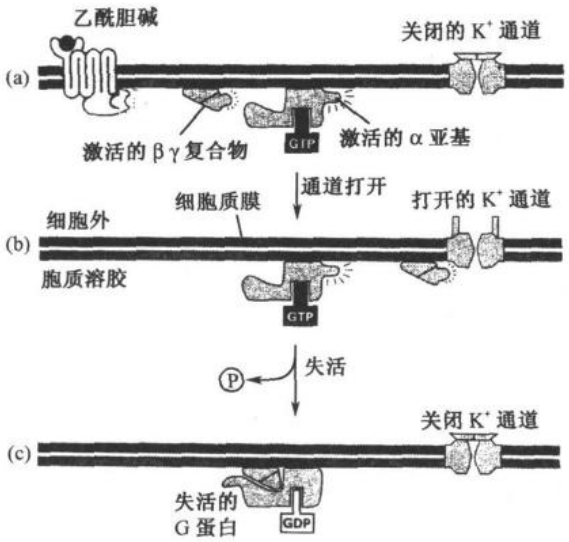


图 5-29　G 蛋白偶联受体能够激活心肌质膜的 K^+ 离子通道打开（引自 Alberts *et al*., 1994）
(a) 神经递质乙酰胆碱与心肌细胞的膜受体结合，使得 G 蛋白的 α 亚基与 βγ 亚基分开；(b) 激活的 βγ 亚基复合物同 K^+ 离子通道结合并将 K^+ 离子通道打开；(c) α 亚基中的 GTP 水解，导致 α 亚基与 βγ 亚基重新结合，使 G 蛋白处于非活性状态，使 K^+ 离子通道关闭。

5.2.2　PKA 系统的信号转导机理

在动物体内，葡萄糖是以不溶的糖原形式储存起来的。脊椎动物中糖原的分解受激素控制，如胰高血糖素和肾上腺素。胰高血糖素和肾上腺素都是很小的水溶性的胺，它们在结构上没有相同之处，为什么却能引起相同的生物学效应？后来发现，它们是通过作用于膜受体后，激活 G 蛋白偶联系统，产生 cAMP 后，激活蛋白激酶 A 进行信号的放大。

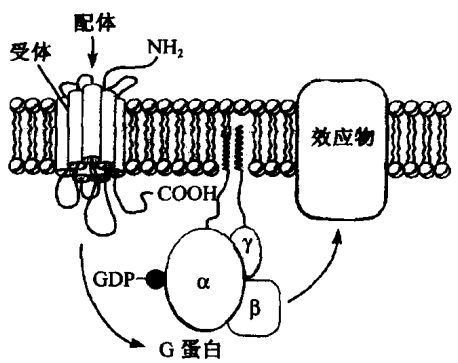


图 5-30　G 蛋白偶联的膜结合机器
（引自 Karp, 1996）
与该受体结合的细胞外信号分子包括肾上腺素和胰高血糖素，受体含有7次跨膜的α螺旋，同配体结合后，激活三体G蛋白。激活的G蛋白可作用于效应物，引起下游反应。

cAMP 作为第二信使主要是通过激活蛋白激酶 A 进行信号放大，故将 cAMP 引起的信号转导系统称为 PKA 系统（protein kinase A system）。在该系统中，细胞外信号与相应受体结合，通过调节细胞内第二信使 cAMP 的浓度引起信号转导。细胞外的信号通常是激素，对 cAMP 水平的调节，则是由腺苷酸环化酶控制的。

5.2.2.1　G 蛋白偶联的膜结合机器

在 PKA 系统中，参与将细胞外信号转变为细胞内第二信使的是 3 种不同的蛋白质（酶）：表面受体、G 蛋白和效应物（图 5-30），由于这三种复合物都结合在膜上，并由 G 蛋白偶联，故将它们称为 G 蛋白偶联的膜结合机器（membrane-bound

machinery)。

表面受体　G蛋白偶联受体都是7次跨膜的膜整合蛋白，包括肾上腺素（β型）受体，胰高血糖素受体、促甲状腺素受体、后叶加压素受体、促黄体生长素受体、促卵泡激素受体等。

G蛋白　G蛋白是该系统中的重要成员，在信号转导中起桥梁作用，使受体和效应物偶联起来，将细胞外信号转变为细胞内的信号，所以G蛋白也称为偶联蛋白或信号转换蛋白。

效应物（effector）　所谓效应物是指直接产生效应的物质，通常是酶，如腺苷酸环化酶、磷脂酶等，它们是信号转导途径中的催化单位。效应物通常也是跨膜糖蛋白。表5-5列出了由膜结合机器引起的信号转导及生理效应。

表5-5　异质三体G蛋白介导的生理效应

配体	受体	效应物	生理效应
肾上腺素	β-肾上腺受体	腺苷酸环化酶	糖原水解
血清紧张素	血清紧张素受体	腺苷酸环化酶	行为敏感好学
光	视紫红质	cGMP磷酸二酯酶	视觉兴奋
IgE抗原复合物	肥大细胞Ig-受体	磷脂酶C	分泌
f-Met肽	趋化受体	磷脂酶C	趋化性
乙酰胆碱	毒蝇碱性乙酰胆碱受体	K^+通道	降低起搏活性

5.2.2.2　PKA系统跨膜信号转导机制

在该系统中，G蛋白的作用主要是将信号从受体传递给效应物，它包括3个主要的反应过程（图5-31）。

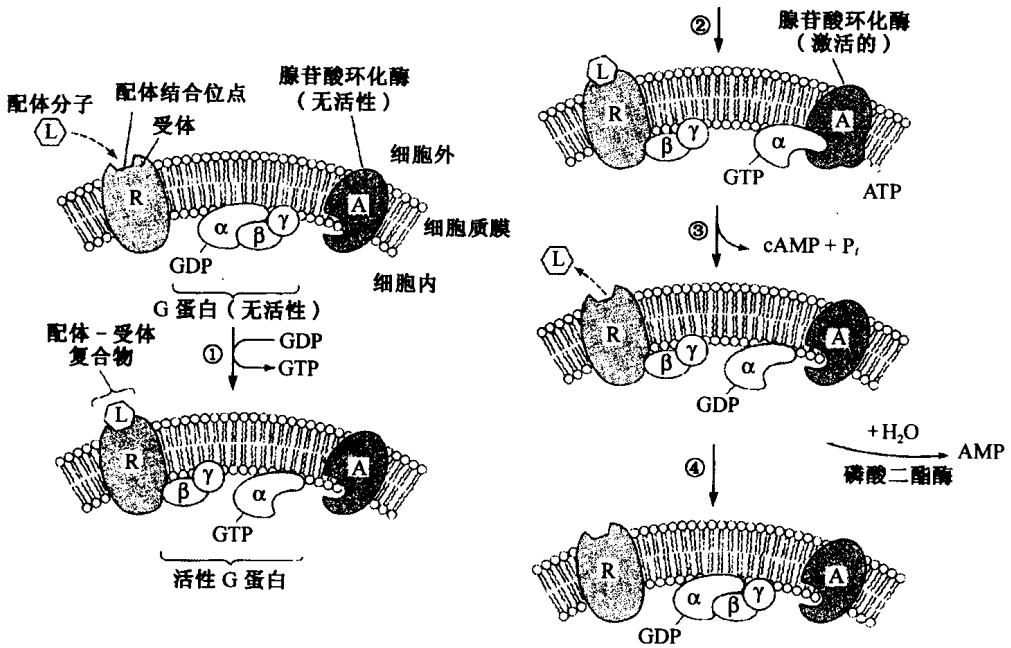


图5-31　G蛋白和cAMP在信号转导中的作用（引自 Becker *et al.*, 1996）

G 蛋白被受体激活　当配体与受体结合时，引起受体的构型改变，从而提高与 G 蛋白的亲和力，这也是细胞信号分子的惟一功能。结合有配体的受体在细胞质膜的内侧面与 G 蛋白结合，形成受体-G 蛋白复合物。与受体结合的 G 蛋白 α 亚基释放出 GDP，并与 GTP 结合，这样就使 G 蛋白成为活性状态。

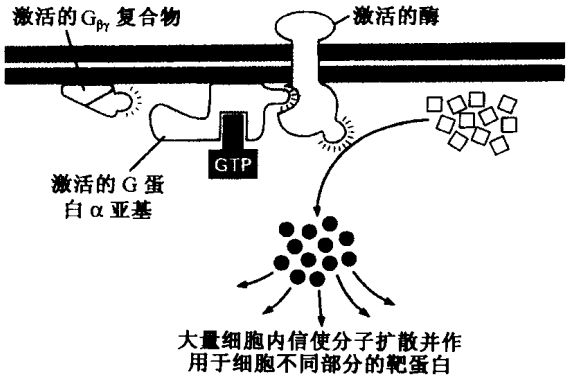


图 5-32　G 蛋白激活酶并引起细胞内信使分子的合成（引自 Alberts *et al.*, 1998）

G 蛋白将信号向效应物转移　GTP 取代 GDP 改变了 G 蛋白 α 亚基的构型，使得它与 G 蛋白的另外两个亚基 β、γ 分开，而 β 和 γ 两个亚基仍以 $G_{\beta\gamma}$复合物存在。与 GTP 结合的 G_α 单独去激活效应物分子（如腺苷酸环化酶）产生第二信使。只要 G_α-GTP与效应物结合，就会不断产生第二信使（图 5-32）。

应答终止　当与 G_α 结合的 GTP 被水解成 GDP 时，信号转导就会终止。因此，GTP 水解的速率在某种程度上决定着信号转导的强度和时间的长短。α 亚基具有较弱的 GTPase 的活性，能够缓慢地水解 GTP，进行自我失活．失活可通过与 GAP 的作用而加速。一旦 GTP 水解成 GDP，G_α-GDP 能够重新与 $G_{\beta\gamma}$复合物恢复结合，形成非活性的三体复合物。

5.2.2.3　第二信使：cAMP

cAMP 是由腺苷酸环化酶（adenylate cyclase, AC）水解细胞质中 ATP 产生的（图 5-33）。腺苷酸环化酶是膜整合蛋白，它的氨基端和羧基端都朝向细胞质。AC 在膜的细胞质面有两个催化结构域，还有两个膜整合区，每个膜整合区分别有 6 个跨膜的 α 螺旋。哺乳动物中已发现 6 个腺苷酸环化酶异构体。由于 AC 能够将 ATP 转变成 cAMP，引起细胞的信号应答，故此，AC 是 G 蛋白偶联系统中的效应物。

1957 年 Sutherland 及其同事们在研究狗肝组织中糖原是如何断裂时发现了 cAMP，这是代谢研究的一个重要里程碑。Sutherland 和他的同事们利用离体系统研究激素的生理反应，经过多次努力后，他们发现胰高血糖素或肾上腺素与细胞一起温育能够激活磷酸化酶。破碎细胞并经离心分部后，分别收集颗粒和溶液，发现磷酸化酶只存在于上清液中；但是，如果要对激素做出应答，颗粒是必不可少的。后来的实验表明，对激素的应答至少涉及两个不同的过程。如果分离肝的匀浆液中的颗粒部分，并将分离的颗粒与激素一起温育，然后将与激素温育过的颗粒添加到上清液中，发现有某种物质的产生，这种物质能够激活磷酸化酶。

Sutherland 鉴定了从膜颗粒中释放出的物质是一种小分子的环状单磷酸腺苷，即 cAMP。由于 cAMP 是激素作用膜受体后释放出来的，并且能激活磷酸化酶的活性，所以 cAMP 被称为第二信使。

虽然 cAMP 是第一信使作用于膜颗粒后产生的第二信使，至于 cAMP 是如何产生的却有几种推测。最简单的推测是与激素结合的受体本身就有催化 ATP 生成 cAMP 的能力，即

cAMP 是受体催化的。如此解释，就同 G 蛋白和腺苷酸酸环化酶毫无关系了。

为了证明 cAMP 的产生与第一信使及 G 蛋白偶联膜结合机器的 3 个成员密切相关，科学家们进行了一系列实验获得了证据，证明它们是独立的 3 个成员，共同完成信号转导。

Orly 和 Schramm 通过细胞融合实验首先证明了受体与腺苷酸环化酶是不同的两种蛋白。用于融合实验的两个细胞中一个是带有肾上腺激素受体但缺少腺苷酸环化酶的红细胞，另一个是带有腺苷酸环化酶但缺少肾上腺激素受体的肿瘤细胞。细胞融合以后，加入肾上腺激素能够产生 cAMP，而在未融合的细胞中加入肾上腺激素则不会有 cAMP 的产生（图 5-34）。

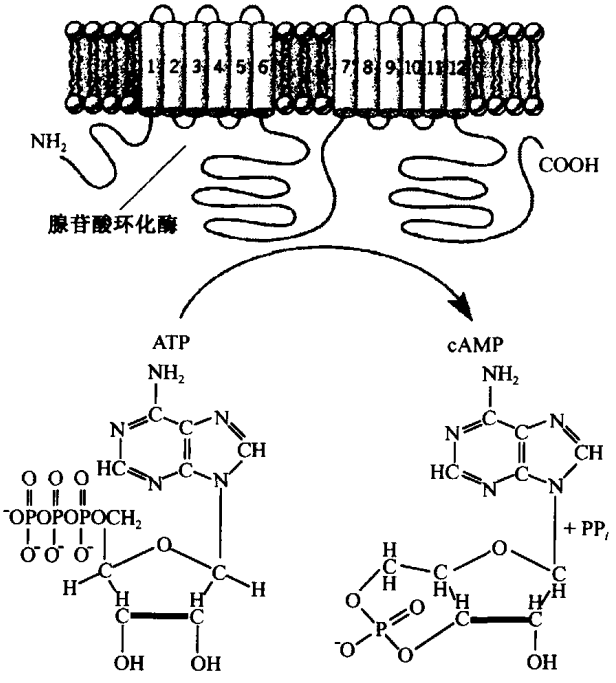


图 5-33　腺苷酸环化酶催化 ATP 生成 cAMP
（引自 Karp, 1996）

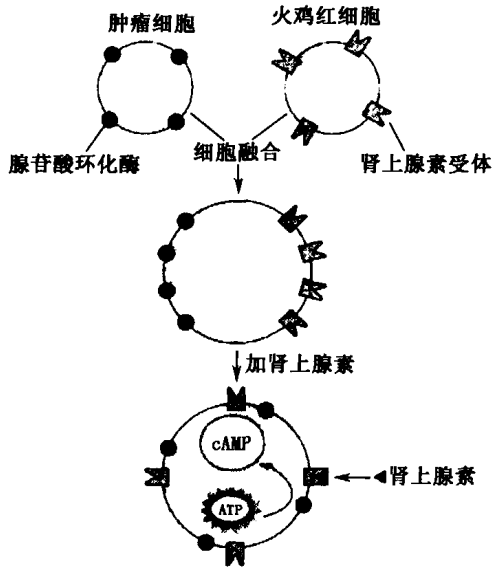


图 5-34　证明肾上腺素受体与腺苷酸环化酶是两种不同蛋白的细胞融合实验
（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

虽然证明了激素受体和腺苷酸环化酶是两个独立的成员，但是，同受体结合的激素又是如何激活腺苷酸环化酶？最早是通过一种称为 *cyc*$^-$ 突变的肿瘤细胞系发现 GTP 能够增强激素对腺苷酸环化酶的激发作用。这种突变细胞具有正常的腺苷酸环化酶和肾上腺激素受体，但是用肾上腺素处理不能促进 cAMP 的生成。如果在该细胞培养基中加入从正常细胞分离的 G 蛋白，就能够恢复对 cAMP 合成的激发作用。由于这种 G 蛋白能促进（stimulating）cAMP 的合成，故称之称为 Gs。

上述实验结果令人信服地证明该系统中 3 个成员的存在和各自独立的作用。

很多不同类型的细胞都是通过 cAMP 浓度的变化引起细胞的应答。正常细胞中 cAMP 的浓度为 $10^{-7}mol\cdot L^{-1}$，经激素诱导后，一秒钟可增加 20 倍。哺乳动物细胞中由 cAMP 介导的信号转导列于表 5-6。在无脊椎动物中 cAMP 也可作为第二信使起作用。

表 5-6　某些通过 cAMP 介导的激素应答实例

组织	激素	应答
肝	肾上腺素和胰高血糖素	糖原水解，葡萄糖合成（糖异生），糖原合成的抑制
骨骼肌	肾上腺素	糖原分解，糖原合成的抑制
心肌	肾上腺素	加快收缩
脂肪	肾上腺素、ACTH、胰高血糖素	三酰甘油降解
肾	加压素（ADH）	提高表皮细胞对水的通透性
甲状腺	TSH	甲状腺激素分泌
肾上腺	ACTH	增强糖皮质激素的分泌
骨	甲状旁腺素	增强钙的再吸收
卵巢	LH	增强胆固醇激素的分泌

5.2.2.4　激活型和抑制型 cAMP 信号途径

在 PKA 系统中，G 蛋白更多的作用是激活下游的酶活性。但是在某些细胞中，G 蛋白不仅可激活酶活性（上调，up regulation），也可抑制其作用的酶活性（下调，down regulation），因此有刺激型和抑制型两种不同的系统（图 5-35）。刺激型是由刺激型的第一信使作用于刺激型的受体，经刺激型的 G 蛋白去激活腺苷酸环化酶活性，从而提高 cAMP 的浓度引起细胞的反应。而抑制型的 cAMP 信号途径则是通过抑制型的第一信使作用于抑制型的受体，经抑制型的 G 蛋白去抑制腺苷酸环化酶的活性。

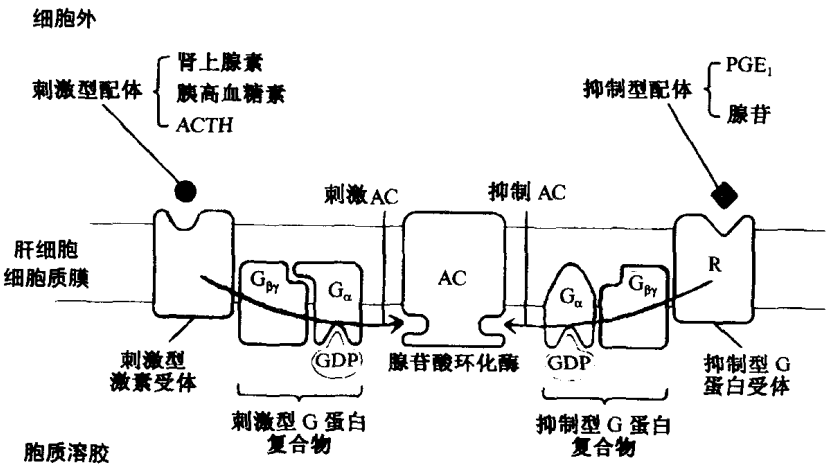


图 5-35　刺激型和抑制型 G 蛋白偶联系统（引自 Lodish *et al.*，1995）

这两种系统都是由受体、G 蛋白和效应物 3 部分组成，但有一些差别。

受体

刺激型受体（stimulatory receptor，R_s）接受刺激型信号后通过 G_s 来刺激腺苷酸环化酶的活性。属于此类受体的有：肾上腺素（β 型）受体、胰高血糖素受体、促甲状腺素受体、后叶加压素受体、促黄体生长素受体、促卵泡激素受体等。作用于激活型受体的信号分子有肾上腺素、胰高血糖素以及 ACTH 等（表 5-7）。

抑制型受体（inhibitory receptor，R_i）通过 G_i 抑制腺苷酸环化酶的活性，降低细胞质中 cAMP 的水平。已知有几十种 R_i 受体，如乙酰胆碱（M 型）受体、肾上腺素（α_2 型）受体等，作用于抑制型受体的第一信使有前列腺素 PGE1 和腺苷。

表 5-7　某些可以提高 cAMP 浓度的激素及其功能

激素	组织	引起的反应
促肾上腺皮质素（ACTH）	肾上腺	氢化可的松的形成
促甲状腺激素（TSH）	甲状腺	甲状腺素形成
促黄体素（LH）	卵巢	孕酮的形成
加压素	肾	水的吸收
胰高血糖素	脂肪组织	脂肪裂解
胰高血糖素	肝	糖原裂解
甲状旁腺素	肾	磷的分泌
甲状旁腺素	骨	骨质吸收
肠泌素	肠	胰腺酶释放
肾上腺素	心肌	加快收缩
肾上腺素	肝	糖原裂解
肾上腺素	红细胞	提高 Na^+ 通透性

G 蛋白

刺激型 G 蛋白称为 G_s 蛋白（stimulatory G protein，G_s 蛋白），接受了激活型受体的信号后，激活腺苷酸环化酶，使该酶激活，提高细胞质中 cAMP 的浓度。

抑制型 G 蛋白称为 G_i 蛋白（inhibitory G-proteins，G_i 蛋白），接受抑制型受体的信号后，能够抑制腺苷酸环化酶的活性，减少 cAMP 的产生。

从结构上看，G_s 蛋白和 G_i 蛋白都是膜蛋白，都是由 α、β、γ 3 个亚基组成，其中，β、γ 2个亚基通常紧密结合在一起。α 亚基上有 3 个功能位点：鸟苷酸（GDP 或 GTP）结合位点、GTPase 活性位点、ADP 核糖化位点。二者的不同之处是：G_s 的 α_s 亚基能被霍乱毒素 ADP 核糖基化，而 G_i 的 α_i 亚基能被百日咳毒素 ADP 核糖基化。

效应物

它们的效应物都是腺苷酸环化酶，不过作用的效果不同。

5.2.2.5　蛋白激酶 A 与底物磷酸化

蛋白激酶 A（PKA）又称 cAMP 依赖的蛋白激酶（cyclic-AMP dependent protein kinase），是一种结构最简单、生化特性最清楚的蛋白激酶。一般认为，真核细胞内几乎所有的 cAMP 的作用都是通过活化 PKA，从而使其底物蛋白发生磷酸化而实现的（图 5-36）。

PKA 全酶分子是由 4 个亚基组成的四聚体（图 5-36）其中 2 个是调节亚基（regulatory subunit，R 亚基），另 2 个是催化亚基（catalytic subunit，C 亚基）。R 亚基的分子质量为 49～55kDa，C 亚基的分子质量为 40kDa，总分子质量约为 180kDa；全酶没有活性。在大多数哺乳类细胞中，至少有两类蛋白激酶 A，一类存在于胞质溶胶，另一类结合在质膜、核膜和微管上。蛋白激酶 A 的功能是将 ATP 上的磷酸基团转移到特定蛋白质的丝氨酸或苏氨酸残基上进行磷酸化，被蛋白激酶磷酸化了的蛋白质可以调节靶蛋白的活性。

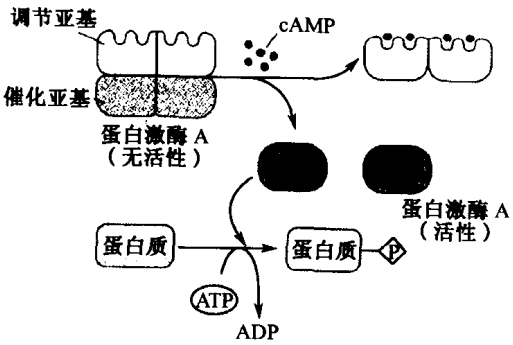


图 5-36　cAMP 激活蛋白激酶 A
（引自 Kleinsmith *et al.*，1995）
cAMP 与 PKA 的调节亚基结合，使 PKA 的调节亚基与催化亚基分开，被激活的催化亚基可使底物磷酸化。

激酶是激发底物磷酸化的酶，所以 PKA 的作用主要是将底物磷酸化。磷酸化和去磷酸

化是信号转导中最简便而又十分快速的反应方式，一般是通过磷酸化而激活、去磷酸化而失活，磷酸成为蛋白（酶）的活性标记。例如，磷酸酶-1的激活是受一种称为抑制剂-1（inhibitor-1）的蛋白控制，而这种抑制蛋白又是通过磷酸化和去磷酸化进行活性与非活性状态的转换（图5-37）。抑制剂-1的磷酸化是由依赖于cAMP的PKA催化的。当cAMP的水平很高时PKA具有活性，抑制剂-1被激活，此时的磷酸酶-1受到抑制。然而，当cAMP的浓度很快下降时，抑制剂失活，从而激活了磷酸酶-1，被激活的磷酸酶-1脱去磷酸化酶上的磷酸，终止了糖原的裂解。

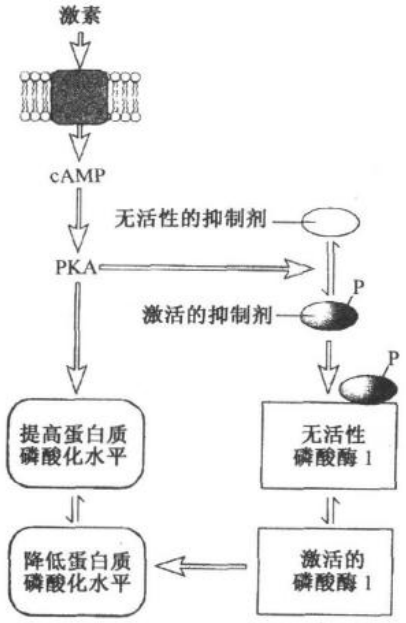


图5-37　抑制剂-1的磷酸化和去磷酸化在激素应答中的作用（引自Karp，1996）

激素诱导生成的cAMP激活了cAMP依赖性的蛋白激酶A，PKA可使底物磷酸化，通过磷酸化导致抑制剂-1的激活，被激活的抑制剂-1使磷酸酶-1失活，其结果可提高蛋白质磷酸化水平。如果cAMP水平下降，将会逆转上述反应。

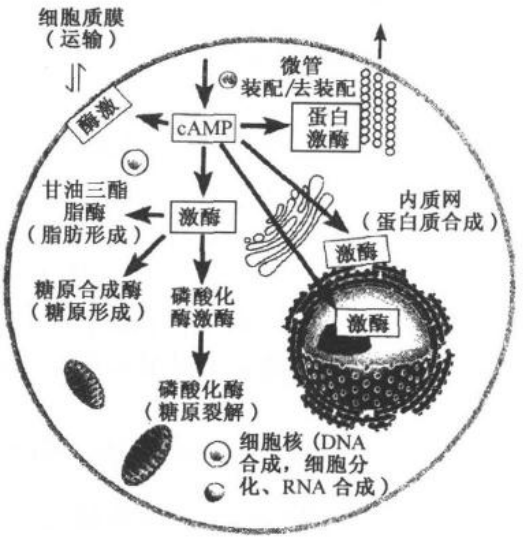


图5-38　cAMP与蛋白激酶对细胞活性的影响（引自Karp，1996）

5.2.2.6　蛋白激酶A的细胞质功能与细胞核功能

蛋白激酶A被cAMP激活后能够作用于多种底物，引起多种反应（表5-8），既可直接修饰细胞质中的底物蛋白，使之磷酸化后立即起作用，也可以进入细胞核作用于基因表达的调控蛋白（如CREB）启动基因的表达(图5-38)，也就是说蛋白激酶A既有细胞质功能又有细胞核功能。

表5-8　可被PKA磷酸化的某些底物

肌钙蛋白I	磷酸化酶激酶	肌糖原合成酶
激素敏感性脂酶	丙酮酸激酶	乙酰胆碱受体δ
肝酪氨酸羟化酶	S6核糖体蛋白	磷酸化酶激酶α
蛋白磷酸酶抑制剂-1	磷酸化酶激酶β	肌球蛋白轻链激酶
乙酰CoA羧化酶	果糖-1，6-二磷酸酶	磷酸果糖激酶
CREB（cAMP效应元件结合因子）	磷酸酶-1蛋白	

蛋白激酶 A 的细胞质功能：糖原分解

哺乳动物细胞中糖原的分解是第二信使 cAMP 通过 PKA 激活细胞质中的靶酶引起信号转导的典型例子。在脊椎动物中，糖原的分解受一些激素的控制，如肾上腺素和胰高血糖素中的任何一种同细胞膜受体结合，都会激活磷酸化酶，使糖原分解成 1－磷酸葡萄糖，这是糖原分解的第一步。这一过程涉及 cAMP 的生成、蛋白激酶 A 的激活、磷酸化酶激酶的激活等一系列的酶促反应（图 5-39）。

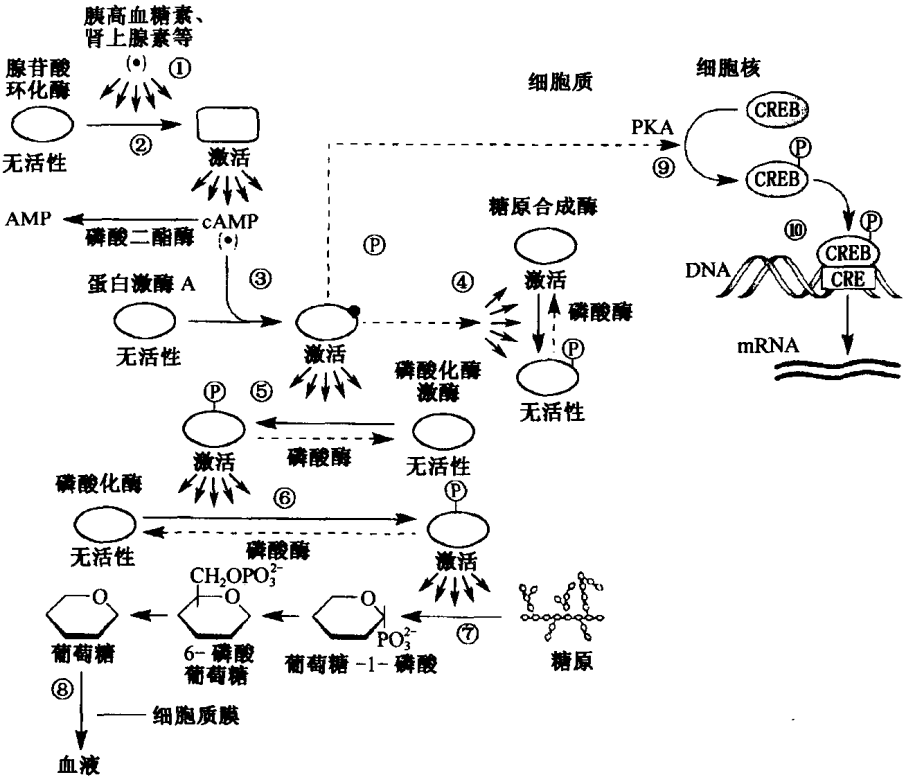


图 5-39　肝细胞对胰高血糖素和肾上腺素的应答及蛋白激酶 A 的细胞质和细胞核功能（引自 Karp，1996）

反应伊始，胰高血糖素或肾上腺素同受体结合，通过 G 蛋白激活腺苷酸环化酶，激活的腺苷酸环化酶催化 ATP 生成 cAMP，cAMP 扩散进入细胞质。然后，cAMP 同蛋白激酶 A 的调节亚基的别构位点（allosteric site）结合，将蛋白激酶 A 激活。在肝细胞中，激活的 PKA 有很多作用底物，包括磷酸化酶激酶和糖原合成酶。糖原合成酶的磷酸化抑制了酶的催化活性，阻止了由葡萄糖合成糖原。与此相反，磷酸化酶激酶通过磷酸化激活自身的酶活性，从而催化磷酸化酶的磷酸化（将磷酸基团加到磷酸化酶特异的苏氨酸残基上）。被激活的磷酸化酶可将糖原磷酸化而分解成 1－磷酸葡萄糖，最后生成葡萄糖进入血液循环。

大多数激素在血液中的浓度都很低，不到 10^{-8}mol·L^{-1}，而脊椎动物中血液的体积相当大，所以低浓度的激素和信号放大系统制造了大量的通讯信号。单个信号分子在细胞表面的结合可以激活大量的腺苷酸环化酶，并且在较短的时间内产生大量的第二信使 cAMP。每个 cAMP 可以激活一个 PKA，而 PKA 可以将大量的磷酸化酶激酶磷酸化，从而引起信号的进一步放大。

蛋白激酶 A 的细胞核功能：调节基因表达

被 cAMP 激活的 PKA，大多数在胞质溶胶中激活一些细胞质靶蛋白，也有少数被激活的 PKA 可以转移到细胞核中磷酸化某些重要的核蛋白，其中多数是被称为 CREB 的转录因子（图 5-39）。被磷酸化了的 CREB 能够作用于 DNA 中的特定位点，该位点通常含有被称为 cAMP 效应元件（cAMP response element，CRE）的特别核苷酸序列（TGACGTCA）。CRE 一般位于基因的调节区，对 cAMP 的作用进行应答。如在肝细胞中，有几种酶与糖异生（gluconeogenesis）有关，而这些酶的编码基因含有 CRE 序列。由此看来，肾上腺素和胰高血糖素不仅激活了催化糖原裂解的酶，而且促进了利用小分子前体合成葡萄糖。

5.2.2.7 cAMP 信号的终止

细胞内 cAMP 浓度的升高对细胞的代谢乃至基因表达都有重要影响，因此对 cAMP 的浓度必须进行严格地控制，以免细胞一直处于过敏状态。

只要控制了 cAMP 的形成，或是将已经形成的 cAMP 迅速降解，就可以解除 cAMP 的信号转导作用。

cAMP 信号解除有两种方式。第一种方式是将 cAMP 迅速降解，主要是通过 cAMP 磷酸二酯酶（phosphodiesterase，PDE）将 cAMP 的环破坏，形成 5′-AMP（图 5-40）。

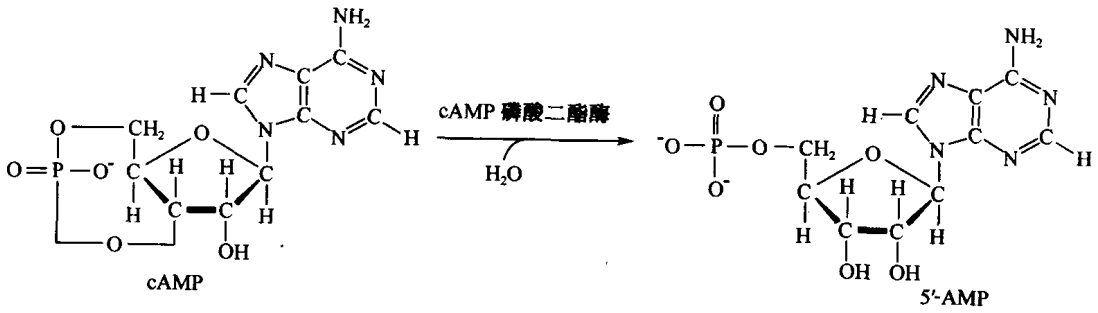


图 5-40 cAMP 磷酸二酯酶催化 cAMP 生成 5′-AMP

第二种方式是通过抑制型的信号作用于 R_i，然后通过 G_i 起作用。抑制型的 G 蛋白偶联受体所起的作用与刺激型的 G 蛋白偶联受体正好相反，它降低细胞中 cAMP 的浓度，这是由抑制性的信号（第一信使）作用于抑制型的受体和抑制型的 G 蛋白所引起的，例如肾上腺素（epinephrine）与几种称为肾上腺素能受体（adrenergic receptor）结合就是最好的例子。机制是 G_i 蛋白被激活后，GTP 同 G_i 蛋白的 α 亚基结合，G_i 的 α 亚基与 G_i βγ 复合物分离，并在细胞膜的胞质面进行扩散；当 G_i 的 α 亚基与腺苷酸环化酶结合后则抑制其活性；而 G_i βγ 复合物则可同激活型的 G_s 的 α 作用，阻止它去激活腺苷酸环化酶。

5.2.2.8 作用于 G 蛋白的毒素

霍乱（cholera）和百日咳（whooping couch）是两种威胁人生命安全的疾病，分别由两种细菌毒素作用于刺激型和抑制型的 G 蛋白所引起。

霍乱弧菌（*Vibrio cholerae*）感染人体后，产生一种毒素：霍乱毒素（cholera toxin，—

种毒蛋白），具有催化作用，可将 NAD^+ 上的 ADP -核糖基团转移到 G_s 的 α 亚基上（图 5-41），使 G 蛋白核糖化（ADP-ribosylation），这样抑制了 α 亚基的 GTPase 活性，从而抑制了 GTP 的水解，使 G_s 一直处于激活状态。其结果使腺苷酸环化酶处于永久活性状态，cAMP 的形成失去控制，引起 Na^+ 和水分泌到肠腔导致严重腹泻。

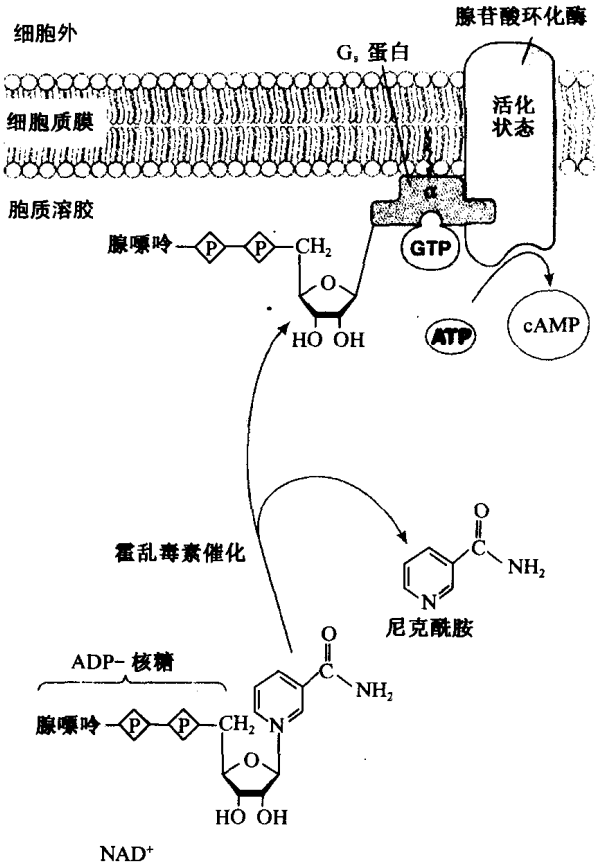


图 5-41　霍乱毒素的作用机制（引自 Kleinsmith *et al.*，1995）

百日咳则是由百日咳杆菌（*Bordetella pertussis*）所引起，该菌产生的百日咳毒素（pertussis toxin）同样使 G 蛋白的 α 亚基 ADP 核糖化。与霍乱毒素作用机理不同的是，百日咳毒素使 G_i 蛋白 α 亚基进行 ADP 核糖化，阻止了 G_i 蛋白 α 亚基上的 GDP 被 GTP 取代，使其失去对腺苷酸环化酶的抑制作用，其结果也是使 cAMP 的浓度增加。由于百日咳是经呼吸道感染的，被感染的细胞与呼吸系统相关，这些细胞中 cAMP 浓度的提高，促使大量的体液分泌进入肺，引起严重的咳嗽。

5.2.3　PKC 系统的信号转导机制

在 G 蛋白偶联系统的信号转导中，除了通过 cAMP 作为第二信使外，某些信号分子作用于受体后，可产生磷脂酰肌醇作为第二信使，故此称为磷脂酰肌醇信号途径（phosphatidylinositol signal pathway）。

研究证明，在这一信号转导途径中，膜受体与其相应的第一信使分子结合后，激活膜上的 Gq 蛋白（一种 G 蛋白），然后由 Gq 蛋白激活磷脂酶 C_β（phospholipase C_β，PLC_β），将膜上的磷脂酰肌醇二磷酸（phosphatidylinositol biphosphate，PIP_2）分解为两个细胞内的第二信使：二酰甘油（diacylglycerol，DAG）和肌醇三磷酸（inositol triphosphate，IP_3）。IP_3 动员细胞内钙库释放 Ca^{2+} 到细胞质中与钙调蛋白结合，随后参与一系列的反应；而 DAG 在 Ca^{2+} 的协同下激活蛋白激酶 C（protein kinase C，PKC），然后通过蛋白激酶 C 引起级联反应，进行细胞的应答。该通路也称 IP_3、DAG、Ca^{2+} 信号通路，或称 PKC 系统（protein kinase C system）（图 5-42）。

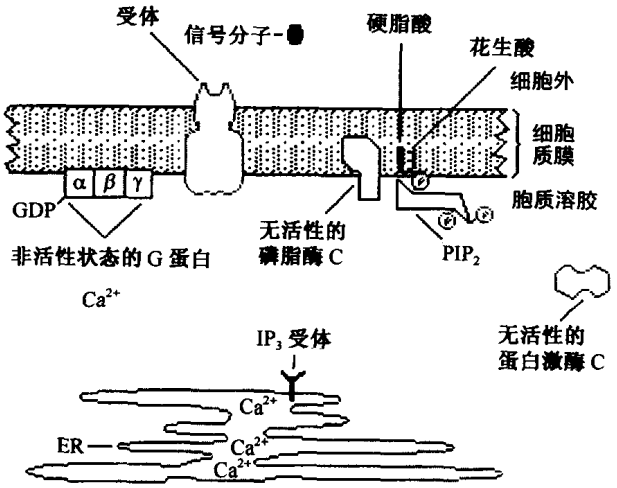


图 5-42　处于静息状态的磷脂肌醇信号转导系统（引自 Alberts *et al.*，1998）

静息状态时，G 蛋白的 α 亚基上结合的是 GDP，所以没有活性，磷脂酶 C 也是处于非活性状态。第二信使 IP_3/DAG 还是以前体 PIP_2 存在。内质网上的 Ca^{2+} 离子闸门通道是关闭的，蛋白激酶 C 也是以可溶的非活性状态存在于细胞质中。

5.2.3.1　膜结合机器

如同 cAMP 信号转导途径，磷脂肌醇信号转导也是由 3 个成员组成的：受体、G 蛋白和效应物。Gq 蛋白也是异源三体，其 α 亚基上具有 GTP/GDP 结合位点，作用方式与 cAMP 系统中的 G 蛋白完全相同。该系统的效应物是磷脂酰肌醇特异的磷脂酶 C_β（phosphatidylinositol-specific phospholipase C_β，PLC_β），此处的 β 表示磷脂酶 C 的一种异构体。与该系统受体结合的信号分子有各种激素、神经递质和一些局部介质（表 5-9）。

表 5-9　某些激活磷脂酶 C 的信号分子

信号分子	靶细胞	反应
肾上腺素	肝细胞（α1 受体）	糖原裂解
加压素	肝细胞	糖原裂解
PDGF	成纤维细胞	细胞增殖
乙酰胆碱	平滑肌（毒蝇碱性受体）	收缩
凝血酶	血小板	凝结

5.2.3.2　第二信使的产生

磷脂肌醇信号途径的关键反应是 PIP_2 水解成两种第二信使：IP_3 和 DAG。由于该途径中的关键酶蛋白激酶 C 的激活是 DAG 和 Ca^{2+} 共同作用的结果，所以 Ca^{2+} 是该途径的第三种信

号分子。基本过程包括磷脂酶 C 的激活、IP_3/DAG 的生成、Ca^{2+} 的释放。

磷脂酶 C_β 的激活　磷脂酶 C_β 相当于 cAMP 系统中的腺苷酸环化酶，也是膜整合蛋白，它的活性受 Gq 蛋白调节。当信号分子识别并同受体结合后，使受体激活。激活的受体由于构型的改变，细胞质面结构域同 Gq 蛋白结合，从而将 Gq 蛋白的亚基激活。激活的 Gq 蛋白 α 亚基上发生 GTP 与 GDP 的交换并导致结合有 GTP 的 α 亚基从 Gq 蛋白上释放出来。激活的 Gq 的 α 亚基通过扩散与磷脂酶 C_β 接触，并将磷脂酶 C_β 激活。

第二信使 IP_3/DAG 的生成　被激活的磷脂酶 C_β 水解质膜上的 PIP_2，产生 IP_3 和 DAG（图 5-43），这两种脂具有第二信使作用，将细胞外的信号进一步放大。

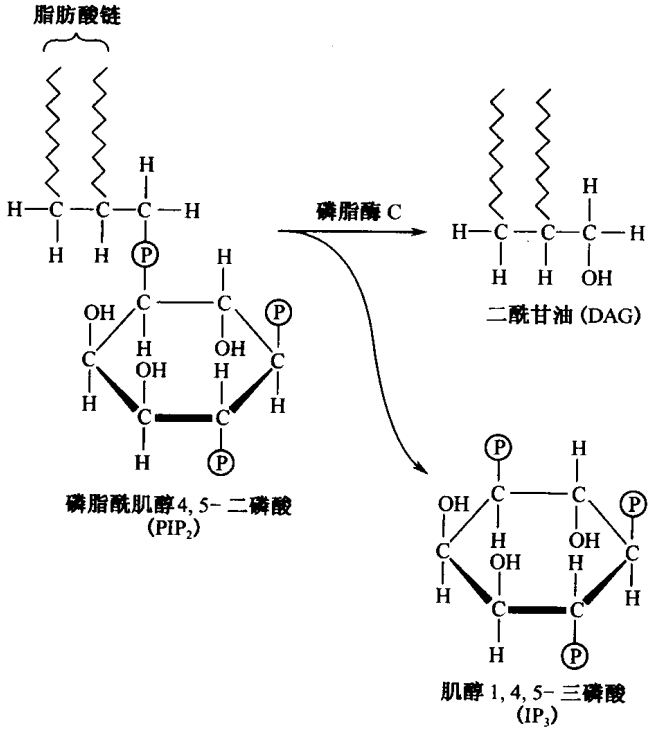


图 5-43　磷脂酶 C_β 催化 PIP_2 水解生成 DAG 和 IP_3

PIP_2 是质膜上磷脂酰肌醇（phosphatidylinositol，PI）的衍生物，由 PI 激酶将 PI 磷酸化，生成 PIP，然后由 PIP 激酶将 PIP 进一步磷酸化，生成 PIP_2。

IP_3 启动第二信使 Ca^{2+} 的释放　由 PIP_2 水解后产生的 IP_3 是水溶性的小分子，它可以离开质膜并迅速在胞质溶胶中扩散。IP_3 同内质网膜上特异的 IP_3 受体结合，使 IP_3 -闸门 Ca^{2+} 释放通道打开，使 Ca^{2+} 从内质网中释放出来，导致细胞内 Ca^{2+} 浓度瞬间增高。释放出的 Ca^{2+} 作为第二信使能够引起许多不同的细胞反应。最直接的作用有两个，第一个是协同 DAG 激活蛋白激酶 C，第二是 Ca^{2+} 与钙调蛋白结合直接引起细胞的其他反应。

内质网上的 IP_3 受体是一种由分子质量为 260kDa 的糖蛋白组成的同质四聚体，4 个亚基组成一个跨膜的通道，每个亚基都有 IP_3 结合的位点，当 3～4 个位点被 IP_3 占据时，受体复合物构像发生改变，打开离子通道，储藏在内质网中的 Ca^{2+} 随即释放，进入胞质溶胶。

5.2.3.3 蛋白激酶 C 的激活

第二信使 cAMP 的作用对象是 cAMP 依赖性的蛋白激酶 A，而第二信使 IP_3/DAG 的信号级联反应则要通过蛋白激酶 C（protein kinase C，PKC），所以由 IP_3/DAG 进行的信号转导又称为 PKC 途径。这一途径中的关键步骤是磷脂酶 C 的激活（图 5-44）。

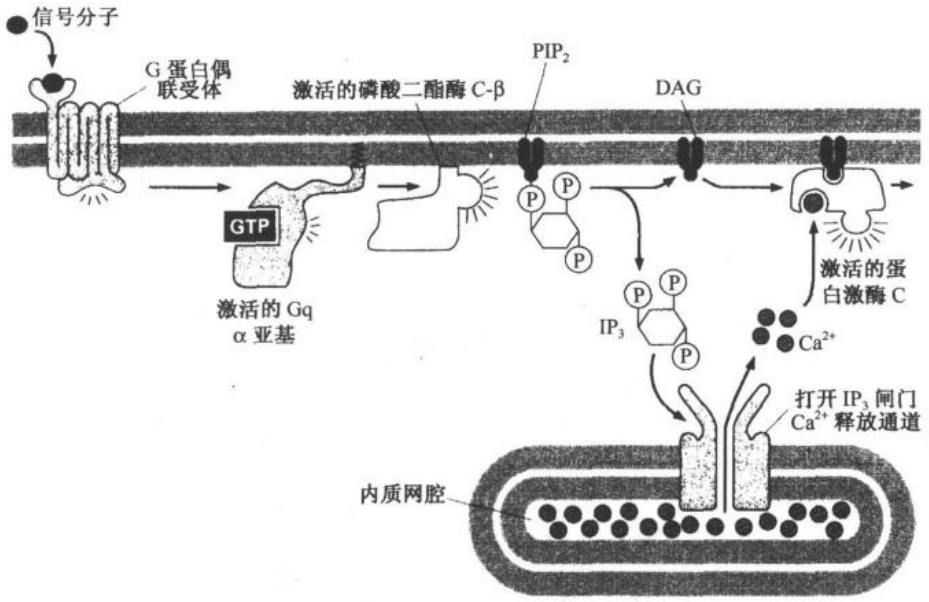


图 5-44 磷脂酰肌醇信号途径（引自 Alberts，2002）

蛋白激酶 C 的激活涉及一系列复杂的反应过程，是 3 种第二信使共同作用的结果。蛋白激酶 C 在非活性状态下是水溶性的，游离存在于胞质溶胶中，激活后成为膜结合的酶。蛋白激酶 C 的激活是脂依赖性的，需要膜脂 DAG 的存在，同时又是 Ca^{2+} 依赖性的，需要胞质溶胶中 Ca^{2+} 浓度的升高。当 DAG 在质膜中出现时，胞质溶胶中的蛋白激酶 C 被结合到质膜上，然后在 Ca^{2+} 的作用下被激活。

DAG 是细胞质膜中的磷脂酶 C 被 Gq 蛋白激活后水解 PIP_2 产生的，PIP_2 的裂解还同时产生了 IP_3。DAG 是脂溶性的，一直处于质膜中，为蛋白激酶 C 与质膜的结合提供了结合位点。IP_3 是水溶性的，生成后进入胞质溶胶，通过扩散与内质网膜上特异的受体结合。实际上，IP_3 是作为内质网膜中 Ca^{2+} 通道的配体与配体闸门通道结合，结果将 Ca^{2+} 通道打开，使 Ca^{2+} 从内质网中释放出来，为蛋白激酶 C 的激活创造了另一个必要的条件。虽然 IP_3 并不直接激活蛋白激酶 C，但它动员了 Ca^{2+} 从钙库中释放，所以说蛋白激酶 C 的激活是 3 种第二信使共同作用的结果。

5.2.3.4 蛋白激酶 C* 的作用

蛋白激酶 C 是一种细胞质酶，在未受刺激的细胞中，PKC 主要分布在细胞质中，呈非活

---

* 蛋白激酶 C 是一个家族或一类相关蛋白的总称，其中有些只要第二信使（如 DAG）就可以被激活，有些则需要同时有 Ca^{2+} 作为辅助因子才能被激活，这就是名称中 C 的含义。

性构像。一旦有第二信使的存在，PKC 将成为膜结合的酶。

蛋白激酶 C 是将靶蛋白的丝氨酸和苏氨酸残基磷酸化的酶，如同蛋白激酶 A，蛋白激酶 C 也是属于多功能丝氨酸和苏氨酸激酶。

蛋白激酶 C 能激活细胞质中的某些酶，参与生化反应的调控，同时也能作用于细胞核中的转录因子，参与基因表达的调控，不过所调控的基因多与细胞的生长和分化相关。

在肝细胞中，蛋白激酶 C 与蛋白激酶 A 协作磷酸化糖原合成酶，同时抑制葡萄糖聚合酶（glucose-polymerizing enzyme）的活性，促进糖原代谢（图 5-45）。

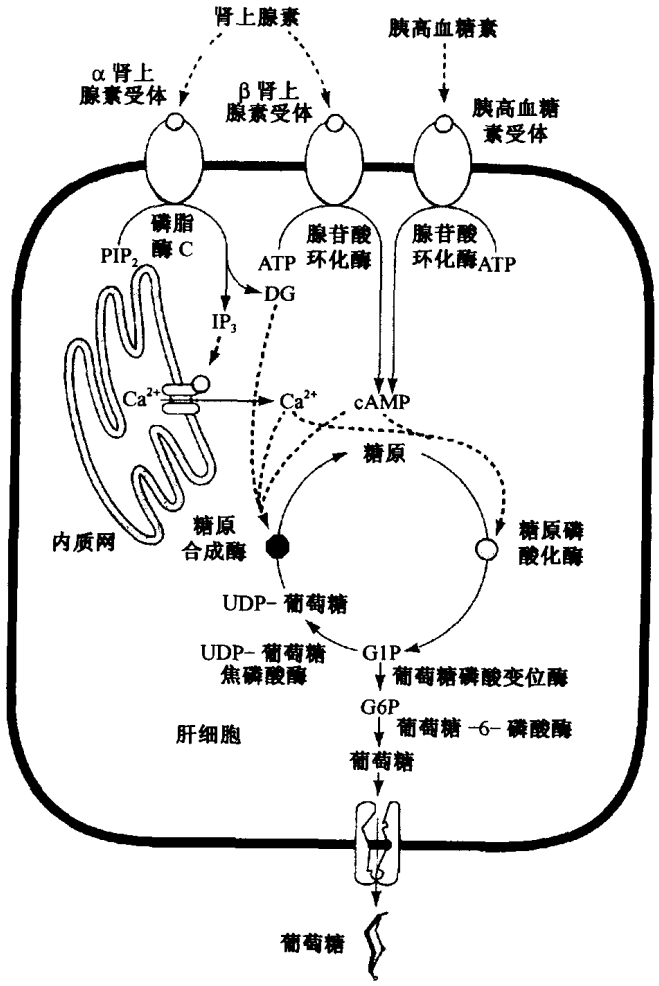


图 5-45　肝细胞中两种第二信使的协同作用，促进糖原分解并抑制糖原合成（引自 Voet *et al*., 1995）

cAMP 介导的促进糖原分解、抑制糖原合成作用是由胰高血糖素受体和 β 肾上腺素受体结合了相应激素所引起；而 IP_3、DAG 和 Ca^{2+} 介导的促进糖原分解和抑制糖原合成的是由 α 肾上腺受体结合肾上腺素所引起。cAMP 激活蛋白激酶 A，而 IP_3、DAG 和 Ca^{2+} 激活蛋白激酶 C。

肌细胞生成素是一种转录因子，在肌细胞分化中起关键作用。在成肌细胞（myoblast）中，蛋白激酶 C 可使肌细胞生成素磷酸化，抑制了肌细胞生成素与 DNA 结合的能力，因而阻止了细胞分化为肌纤维。另外，在脑细胞中，蛋白激酶 C 的浓度很高，它主要磷酸化离子通

道，改变它们的性质以及神经细胞质膜的韧性。

可通过一类从植物中分离的物质——佛波酯的实验研究蛋白激酶 C 对生长的控制作用。佛波酯酷似 DAG，在很多不同的培养细胞中都能激活蛋白激酶 C，使这些细胞失去生长控制，从而具有恶性细胞的行为。如果除去佛波酯，则细胞的生长恢复正常。若通过基因工程的方法构建一个能恒定表达蛋白激酶 C 的细胞，则可持久维持恶性生长，并能引起肿瘤。

蛋白激酶 C 不仅能够在细胞质中引起级联反应，也可以作用于某些基因的表达调控。蛋白激酶 C 至少可通过两种途径参与基因表达的控制（图 5-46）。第一种途径是：蛋白激酶 C 将细胞质中的某些结合有基因表达调控因子的抑制蛋白磷酸化，使抑制蛋白释放出基因调控蛋白，让这些调控蛋白进入细胞核促进特异基因进行表达。第二种途径是：蛋白激酶 C 激活一个级联系统的蛋白激酶，让激活的蛋白激酶磷酸化并激活特定基因表达的调控蛋白。

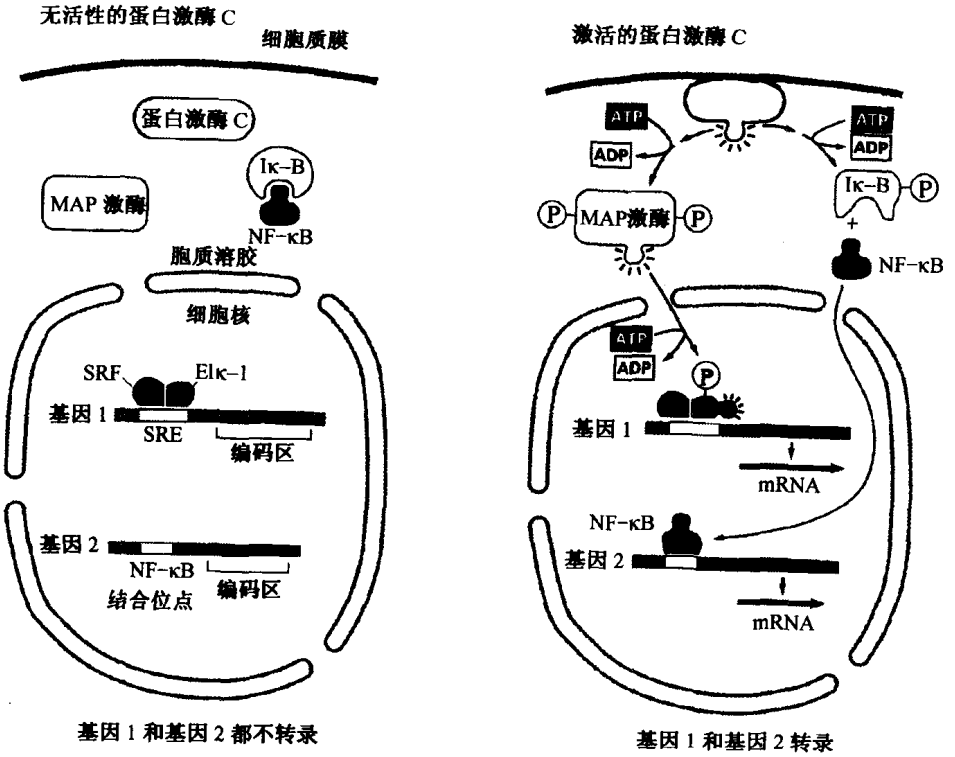


图 5-46　活化的蛋白激酶 C 激活特定基因转录的两条途径（引自 Alberts *et al*., 1994）
一条途径是蛋白激酶激活一系列磷酸化的级联反应，使 MAP 激酶磷酸化并使之活化，活化的 MAP 激酶将基因调节蛋白 Elκ-1 磷酸化，使之激活。活化的 Elκ-1 与血清应答因子（SRF）一起结合在基因 1 上游一个短的 DNA 调控序列（血清效应元件，SRE）上共同调节基因 1 的转录。另一条途径是激活的蛋白激 C 使抑制蛋白 Iκ-B 磷酸化，从而释放基因调节蛋白 NF-κB，使之进入细胞核与基因 2 的调控序列结合启动该基因的转录。

MAP 激酶是促分裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）又叫细胞外信号调节激酶（extracellular signal regulated kinase，ERK）。此酶被细胞外增殖、分化的诱导信号所激活。

蛋白激酶 C 在细胞的生长、分化、细胞代谢以及转录激活等方面具有非常重要的作用

(表 5-10)。

表 5-10　由蛋白激酶 C 介导的某些反应

组织	反应	组织	反应
血小板	分泌血清紧张素	肥大细胞	释放组胺
肾上腺髓质	分泌肾上腺素	胰腺	分泌胰岛素
肝	糖原水解	脂肪组织	脂肪合成
垂体细胞	分泌 GH 和 LH	甲状腺	分泌降钙素
睾丸	睾丸酮的合成	神经元	释放多巴胺

此外，有人认为 PKC 能够催化未被其他激酶催化的蛋白，如催化与分泌和增殖有关的蛋白质磷酸化。还可以活化 Na^+-K^+ 交换系统、使细胞内 H^+ 减少、提高细胞质中的 pH、还可以促进 Na^+/K^+ 泵的运转等。

5.2.3.5　第二信使 Ca^{2+} 的作用

由 IP_3 动员释放到细胞内的 Ca^{2+} 除了参与蛋白激酶 C 的激活以外，在细胞的生命活动中

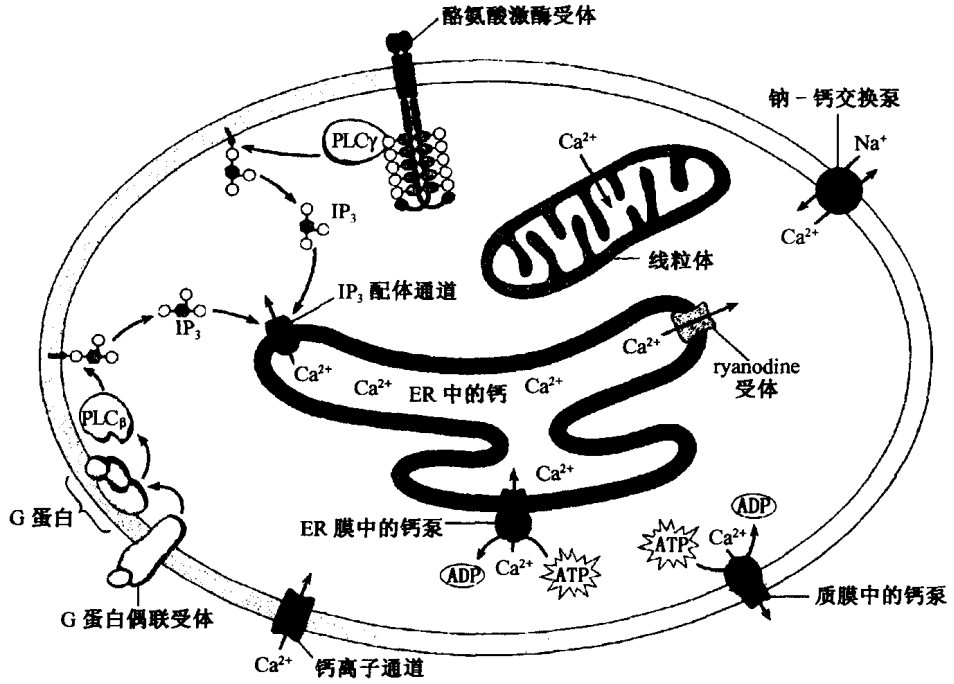


图 5-47　细胞中 Ca^{2+} 浓度的调节（引自 Becker *et al*., 1996）

细胞质膜中的 Ca^{2+} 通道和内质网膜中的 IP_3 及 ryanodine * 受体 Ca^{2+} 通道的打开可使胞质溶胶中的 Ca^{2+} 浓度升高；细胞质膜中 Ca^{2+} 泵、内质网膜中的 Ca^{2+} 泵、细胞质膜中的 Na^+-Ca^{2+} 交换泵，以及线粒体中的 Ca^{2+} 泵降低胞质溶胶中的 Ca^{2+} 浓度。

* ryanodine，植物的一种中性生物碱。ryanodine receptor 是一种离子通道，在肌细胞和非肌细胞中调节细胞内自由钙离子浓度。与 ryanodine 结合部位定位于其羧基末端 76kDa 胰蛋白酶片段。也受 Ca^{2+}、ATP、Mg^{2+}、钌红、咖啡因和钙调蛋白的调节。

还有许多重要作用，包括细胞分裂、分泌活动、内吞作用、受精、突触传递、代谢以及细胞运动。

细胞中 Ca^{2+} 浓度

钙离子在细胞的信号应答中具有重要的调节作用，而这种调节作用是通过改变胞质溶胶中 Ca^{2+} 的浓度进行的。

Ca^{2+} 在结构上与 cAMP 和磷脂酰肌醇有很大的不同，它既不能被合成，又不能被分解，所以它在细胞中不同部位的浓度是由位于膜中的运输蛋白和离子通道控制的。在静息状态的细胞中，Ca^{2+} 浓度维持在非常低的水平，通常低于 $10^{-7}mol \cdot L^{-1}$。但在细胞外和某些膜结合细胞器，如 ER 和植物液泡腔中 Ca^{2+} 浓度比胞质溶胶中要高 10 000 倍。

细胞质中的低 Ca^{2+} 浓度是通过如下机制控制的：①在正常情况下，膜对 Ca^{2+} 是高度不通透的；②质膜和 ER 的膜中含有能够将 Ca^{2+} 从胞质溶胶中泵出到细胞外或泵进 ER 腔的运输泵（图 5-47）。许多不同的刺激，如神经冲动到达肌细胞，都会触发靶细胞通过打开质膜或 ER 膜中 Ca^{2+} 泵进行应答；③Ca^{2+} 通过膜通道扩散，使膜外的 Ca^{2+} 快速进入细胞，使胞质溶胶中 Ca^{2+} 浓度迅速升高。

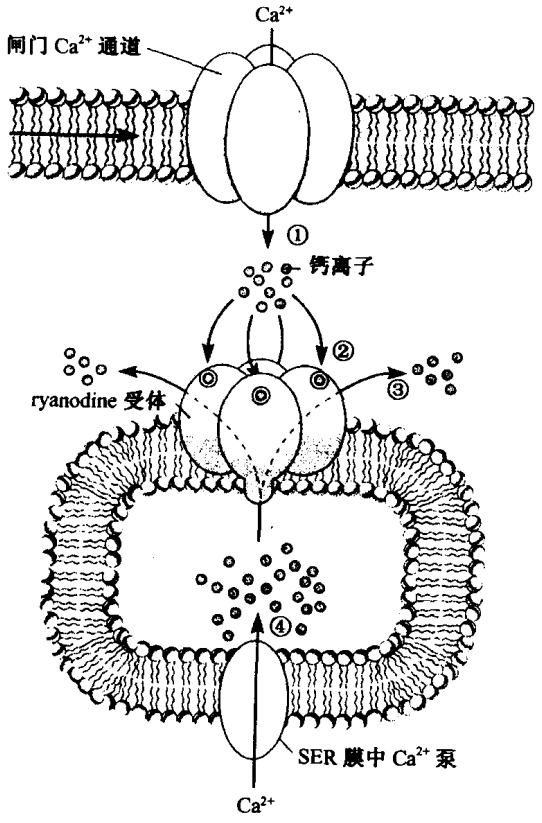


图 5-48　钙诱导的 Ca^{2+} 释放（引自 Karp, 1996）在可兴奋细胞，如心肌细胞，膜电位的改变可引起质膜的电位闸门钙离子通道的打开允许少量的 Ca^{2+} 进入细胞质，然后 Ca^{2+} 同 SER 膜 ryanodine 受体结合，使 Ca^{2+} 释放导致胞质溶胶中 Ca^{2+} 浓度升高。胞质溶胶中的 Ca^{2+} 可被激活的内质网膜中的钙泵泵入到内质网。

细胞质膜中的钙离子泵将胞质溶胶中的 Ca^{2+} 运输到细胞外，而内质网膜中钙离子泵则将 Ca^{2+} 贮藏到内质网腔。除了钙泵以外，某些细胞的质膜中还有 Na^+-Ca^{2+} 交换泵，将 Na^+ 输入到细胞质，而将 Ca^{2+} 从胞质溶胶中输出；此外，线粒体膜也能将钙离子运输到线粒体基质。细胞通过上述的钙离子运输体系将细胞质中的 Ca^{2+} 维持在极低的水平。提高细胞质中钙离子浓度主要是通过各种刺激作用打开细胞质膜和内质网膜中的钙离子通道。

在内质网膜上有两种主要类型的 Ca^{2+} 通道，其中一种是 IP_3 受体，另一种是 ryanodine 受体，这种受体与植物碱结合而打开。ryanodine 受体主要是在刺激型细胞中发现的，在这些细胞中，当达到动作电位时，ryanodine 受体开放，使细胞质中 Ca^{2+} 升高。在不同类型的细胞中，使 ryanodine 受体打开的介质也有所不同，Ca^{2+} 本身也可以将 Ca^{2+} 通道打开。当有限量的 Ca^{2+} 通过质膜进入细胞质时，可以诱导 SER 膜中的 ryanodine 受体打开，使内质网中的 Ca^{2+} 释放到胞质溶胶中（图 5-48），这种现象称为钙诱导的钙释放（calcium-induced calcium

release)。

钙调蛋白

Ca^{2+}能够作用的效应物有很多不同的类型（表 5-11）。依据细胞的不同，钙能够激活或抑制不同的酶或运输系统，改变膜的离子通透性，诱导膜的融合，或者改变细胞骨架的结构和功能。钙离子的这些功能并不是通过自身的直接作用，而是通过同一些钙结合蛋白（calcium-binding protein）的结合，其中有一种钙结合蛋白叫做钙调蛋白（calmodulin，CaM）。

表 5-11　由钙触发的哺乳动物蛋白的例子

蛋白	蛋白的功能	蛋白	蛋白的功能
肌钙蛋白 C	肌收缩的调节剂	凝溶胶蛋白	肌动蛋白切断蛋白
钙调蛋白	蛋白激酶和其他一些酶(MLCK, CaM 激酶 II, 腺苷酸环化酶 I), 的通用调节剂	ryanodine 受体	细胞内 Ca^{2+}释放的效应物
		Ca^{2+}逆向运输蛋白	Ca^{2+}与单价离子交换蛋白
钙视网膜蛋白	鸟苷酸环化酶的激活剂	钙调结合蛋白	调节肌收缩
(需) 钙蛋白酶	蛋白酶	绒毛蛋白	肌动蛋白组织者
PI 特异的 PLC	IP_3 和二乙酰甘油的生成剂	Ca^{2+}-ATP 酶	Ca^{2+}跨膜运输泵
α-辅肌动蛋白	肌动蛋白结合蛋白	IP_3 受体	细胞内使 Ca^{2+}释放的效应物
钙调磷酸酶 B	磷酸酶	[视紫红质] 抑制蛋白	光感受器应答终止蛋白
膜连蛋白	涉及胞吞和胞吐，PLA_2 的抑制	Na^+-Ca^{2+}交换蛋白	Ca^{2+}与 Na^+跨膜交换的效应物
磷脂酶 A2	花生四烯酸的产生	(肌) 集钙蛋白	Ca^{2+}缓冲剂
蛋白激酶 C	通用的蛋白激酶		

钙调蛋白只存在于真核生物中。从不同的动物、植物和真核微生物中分离的钙调蛋白都非常相似。钙调蛋白是水溶性的，存在于胞质溶胶中，是由 148 个氨基酸组成单条多肽，分子质量为 16.7kDa。钙调蛋白的外形似哑铃，有两个球形的末端，中间被一个长而富有弹性的螺旋结构相连，每个末端有两个 Ca^{2+}结构域，每个结构域可以结合一个 Ca^{2+}，这样，一个钙调蛋白可以结合 4 个 Ca^{2+}，钙调蛋白与 Ca^{2+}结合后的构型相当稳定。在非刺激的细胞中钙

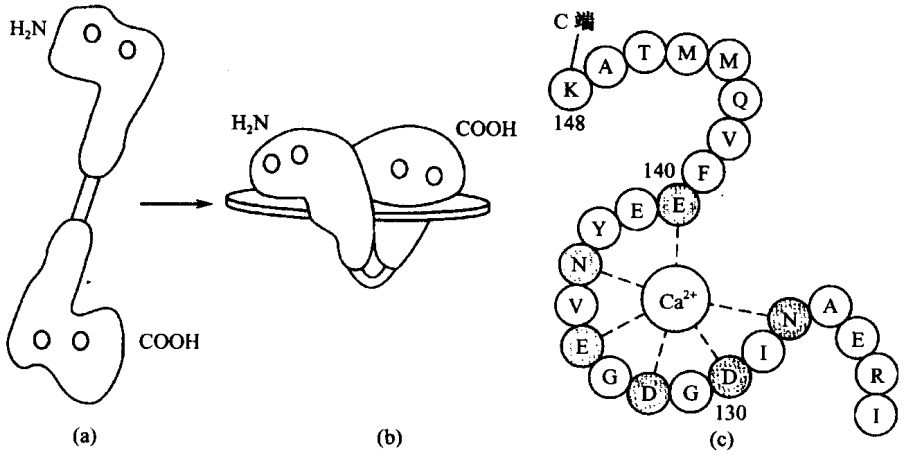


图 5-49　钙调蛋白的结构

(a) 钙调蛋白的哑铃结构，(b) 结合有 Ca^{2+}的钙调蛋白与靶蛋白结合；(c) 钙调蛋白 C 端的一个 Ca^{2+}结合位点的氨基端序列。

调蛋白与 Ca^{2+} 结合的亲和力很低。然而，如果由于刺激使细胞中 Ca^{2+} 浓度升高时，Ca^{2+} 同钙调蛋白结合形成钙-钙调蛋白复合物（calcium-calmodulin complex），就会引起钙调蛋白构型的变化，增强了钙调蛋白与许多效应物结合的亲和力（图 5-49）。

Ca^{2+}-钙调蛋白复合物的信号放大作用

在不同的细胞中，Ca^{2+}-钙调蛋白复合物可以同蛋白激酶、cAMP 磷酸二酯酶以及质膜中的 Ca^{2+} 运输蛋白等结合。在众多的 Ca^{2+}-钙调蛋白的靶蛋白中，有一类特别重要的底物，称为 CaM-蛋白激酶，这是一类 Ca^{2+}-钙调蛋白依赖性蛋白激酶（Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase）。该酶是一个大家族，可使靶蛋白中的丝氨酸和苏氨酸磷酸化。当 CaM-蛋白激酶与 Ca^{2+}-钙调蛋白复合物结合时，成为活性状态，可使一些特异的靶蛋白磷酸化，进行信号放大。

植物细胞中 Ca^{2+} 的调节作用

在植物细胞中 Ca^{2+} 也是重要的第二信使。在光、压力、引力以及各种植物激素的刺激下，植物细胞中的 Ca^{2+} 浓度发生急剧变化。在静息状态下，植物细胞主要是通过质膜和液泡膜中的 Ca^{2+} 运输泵维持胞质溶胶中的低 Ca^{2+} 浓度。

植物叶片中气孔直径大小的调节主要是通过 Ca^{2+} 的第二信使作用调控的（图 5-50）。植物叶的气孔是水分蒸发的主要部位，为了避免脱水，孔径的大小要受严格控制。当保卫细胞（guard cell）中膨压（turgor pressure）降低时，孔径缩小，而保卫细胞中的膨压降低主要是由离子浓度降低而引起。不利条件（如高温、低湿）可刺激脱落酸的释放，导致保卫细胞质膜

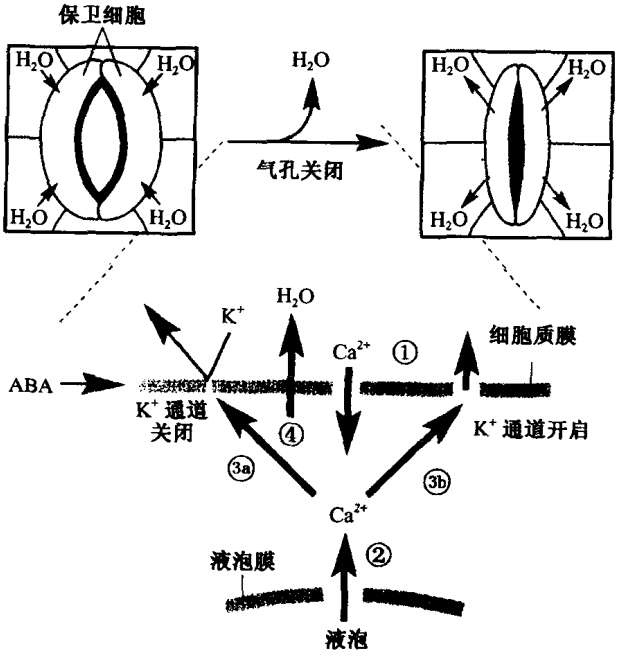


图 5-50　Ca^{2+} 在植物叶保卫细胞关闭中的第二信使作用

（引自 Karp，1999）

当脱落酸（ABA）的水平升高时，质膜中 Ca^{2+} 通道打开，由于 Ca^{2+} 的流入，导致细胞内贮备的 Ca^{2+} 释放到胞质溶胶，结果使胞质溶胶中的 Ca^{2+} 浓度大大升高，最后使细胞内的 K^+ 浓度降低。由于胞质溶胶中的离子浓度降低，水分会丧失，此时立即关闭气孔。

中 Ca^{2+} 通道打开。Ca^{2+} 进入胞质溶胶触发细胞内膜结合细胞器中储备的 Ca^{2+} 释放，提高了胞质溶胶中 Ca^{2+} 浓度。胞质溶胶中的高 Ca^{2+} 浓度导致质膜的 K^+ 输入通道的关闭，并打开 K^+ 输出通道。这些变化的结果是 K^+ 过度外流，从而使细胞的膨压下降，叶孔缩小。

5.2.3.6 IP_3/DAG/Ca^{2+} 信号的终止

如同 cAMP 引起的信号转导，磷脂肌醇和 Ca^{2+} 离子的第二信使作用也必须迅速解除，使细胞重新回到初始状态。

DAG 信号的解除

DAG 只是由 PIP_2 水解得到的暂时性产物，寿命只有几秒钟，靠两种方式进行降解：①被 DAG 磷酸激酶磷酸化，生成磷脂酸（PA），随后 PA 被 CTP 磷酸化为 CMP -磷脂酸，再与肌醇作用合成磷脂酰肌醇（PI）；②DAG 被 DAG 酯酶水解生成单脂酰甘油，再进一步水解成游离的不饱和脂肪酸和花生四烯酸甘油，花生四烯酸甘油再被氧化成许多生物活性代谢物，如前列腺素、白三烯等。从细胞中释放出来的这些生物活性代谢物可作用于自身或邻近细胞上的受体，引起细胞应答。

IP_3 信号的解除

有两种途径终止 IP_3 的信号作用（图 5-51）：①IP_3 被水解，即 IP_3 在 5′-磷酸酶的作用下，水解为 I（1，4）P_2，并且进一步水解成肌醇。5′-磷酸酶是一种膜结合的酶；②在胞浆的肌醇磷酸脂 3 -激酶的作用下，IP_3 被 ATP 磷酸化生成肌醇 1，3，4，5 -四磷酸（inositol-1，3，4，5-tetraphosphate，IP_4），然后被水解成无活性的肌醇 1，3，4 -三磷酸（inositol-1，3，4-trisphosphate），从而解除 IP_3 的作用。

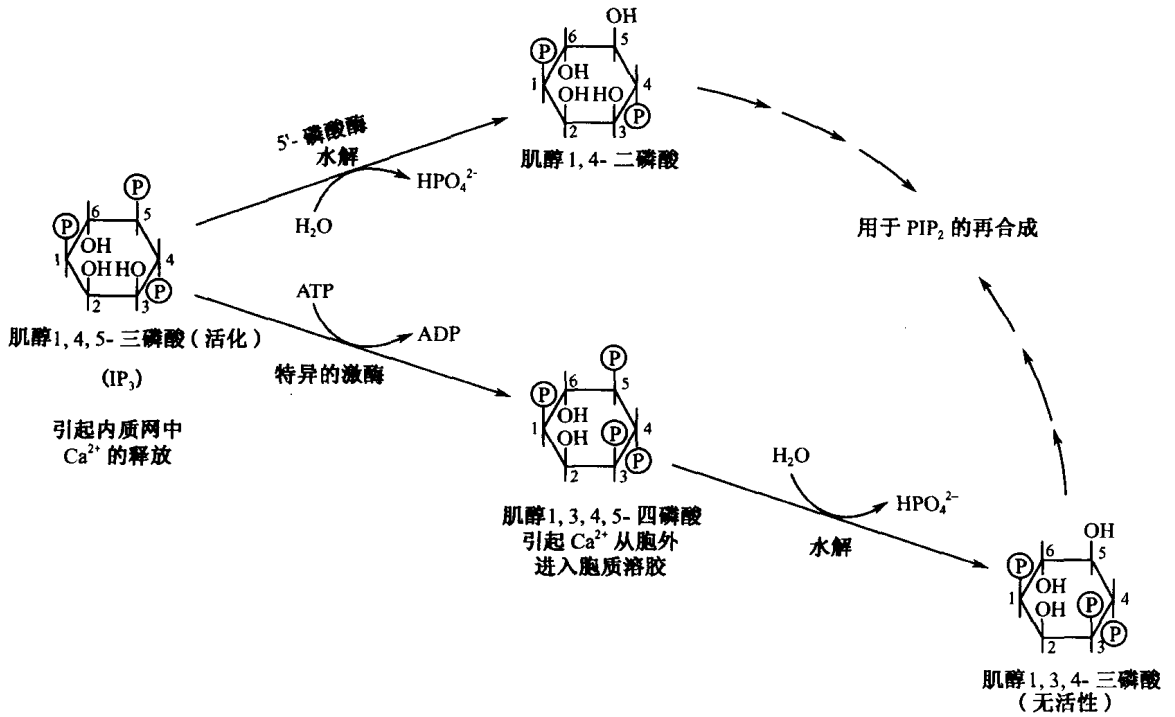


图 5-51　胞质溶胶中 IP_3 的命运

Ca^{2+}信号的解除

Ca^{2+}信号的解除主要是通过降低胞质溶胶中的Ca^{2+}浓度。由IP_3磷酸化生成的四磷酸肌醇参与打开细胞质膜上的Ca^{2+}通道，让胞外的Ca^{2+}（10^{-3} mol·L^{-1}）进入细胞内，使细胞质中的Ca^{2+}浓度较为持续地升高。胞内Ca^{2+}浓度持续升高，会使钙调蛋白活化，活化的钙调蛋白与膜（质膜-内质网膜）上的Ca^{2+}-ATP酶结合，增加酶对Ca^{2+}的亲和力，并使酶的活力提高6～7倍，从而提高转运钙的能力。通过将胞质溶胶中的Ca^{2+}迅速泵到细胞外以及泵进内质网腔中，从而使胞质中的Ca^{2+}浓度迅速恢复到基态水平（10^{-7} mol·L^{-1}），并使激活的CaM-蛋白激酶复合物解离，从而失去活性，最终使细胞恢复到初始状态。

线粒体膜上有Ca^{2+}转运蛋白，能够将细胞质中的Ca^{2+}转运到线粒体基质，所以线粒体也是细胞的Ca^{2+}库。但是，线粒体Ca^{2+}运输蛋白与Ca^{2+}的亲和力很低，常在5～10μmol·L^{-1}才能显示出对Ca^{2+}的运输能力，所以在终止细胞中Ca^{2+}的信号作用方面，线粒体只是起辅助作用，因为只有在细胞内的Ca^{2+}浓度很高时，线粒体才显其英雄本色。

5.3 酶联受体信号转导

同G蛋白偶联受体一样，酶联受体也是跨膜蛋白，细胞外部分有同配体结合的结构域，但是其细胞内结构域却可以作为酶或是同其他的一些蛋白组成复合物后行使酶的作用。酶联受体信号传导（signaling via enzyme-linked receptor）的反应比较慢（通常要几小时），并且需要许多细胞内的转换步骤。

5.3.1 鸟苷酸环化酶受体与第二信使cGMP

这种酶联受体的特点是，受体本身就是鸟苷酸环化酶，其细胞外部分有与信号分子结合的位点，细胞内部分有一个鸟苷酸环化酶的催化结构域，可催化GTP生成cGMP（图5-52）。而cGMP可激活cGMP依赖性蛋白激酶G（cyclic GMP-dependent protein kinase G，PKG），被激活的蛋白激酶G可使特定蛋白质的丝氨酸或苏氨酸残基磷酸化，从而引起细胞反应。因此，该途径中的第二信使是cGMP。

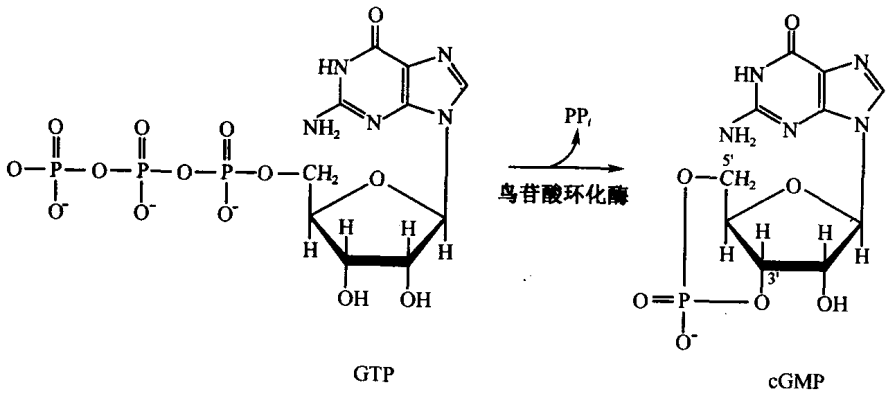


图5-52 鸟苷酸环化酶催化GTP生成cGMP

5.3.1.1 受体的结构

细胞内至少存在两种形式的鸟苷酸环化酶（guanylate cyclase，GC）：与细胞膜结合的膜结合型 GC 和胞浆可溶型 GC。作为酶联受体信号途径的主要是膜结合型 GC（membrane-bound form of guanylate cyclase，mGC）。mGC 是一种跨膜蛋白，氨基末端在膜外侧，是激素配体结合区；膜内侧约为多肽链的 1/2，含有一个类蛋白激酶区以及羧基末端的催化区域。

配体结合结构域（ligand binding domain）　不同的受体可结合不同的第一信使激素，按其与配体结合的特性，可分为 GC-A、GC-B、GC-C。已知 GC-A 结合的是心钠肽；GC-B 结合的是脑钠肽；GC-C 结合的是细菌热稳定肠毒素。

蛋白激酶样结构域（PK-like domain）　定位于质膜与 GC 催化区之间，所有的膜结合型 GC 都含有一个与蛋白激酶高度同源性的蛋白激酶样结构域，它与酪氨酸蛋白激酶的相关性比丝氨酸蛋白激酶更密切。但是否具有蛋白激酶的活性尚待证实。

催化结构域（catalytic domain）　催化 cGMP 生成的部位，定位在细胞质部分的羧基端。

5.3.1.2 cGMP 介导的信号转导

心房钠尿肽（atrial natriuretic factor，ANF）类激素的信号是通过鸟苷酸环化酶受体与第二信使 cGMP 进行信号转导的。心房钠尿肽激素是在血压升高时，由心房肌细胞分泌的一类肽激素。ANF 刺激肾分泌 Na^+ 和水，并诱导血管壁中的平滑肌细胞松弛，这两种效应都会降低血压，分别是通过肾细胞和血管壁平滑肌细胞中的 ANF 受体介导的。ANF 受体是一种单次跨膜蛋白，细胞外结构域有 ANF 结合位点，细胞内结构域有鸟苷酸环化酶催化位点（图 5-46），ANF 的结合会激活鸟苷酸环化酶产生第二信使 cGMP，cGMP 同蛋白激酶 G 结合并使之活化，被激活的蛋白激酶 G 能够使一些靶蛋白磷酸化，引起上述对血压升高的反应，但是其详细机理仍不清楚。

另外，cGMP 在光对视网膜的影响中也有重要作用，cGMP 通过对 cGMP 闸门 Na^+ 通道的控制，影响光受体细胞的膜电位（图 5-53）。

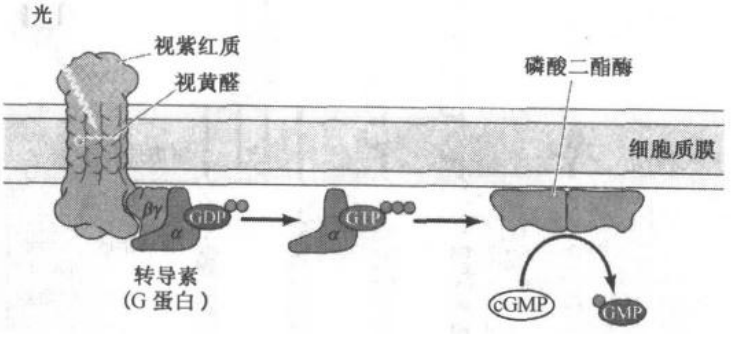


图 5-53　cGMP 在视紫红质中的作用（引自 Cooper，2000）

视网膜中的光受体视紫红质是 G 蛋白偶联受体，此系统的 G 蛋白又叫转导素（trans-

ducin)，是一种能够激活 cGMP 特异性磷酸二酯酶的 G 蛋白。当视紫红质中一种小分子的 11 - 顺式视黄醛吸收光后，可使所有的反式视黄醛异构化，诱导视紫红质蛋白构型的变化而活化。活化的视紫红质可激活 G 蛋白，并由 G 蛋白激活磷酸二酯酶，将 cGMP 磷酸化。从而降低了细胞中 cGMP 的浓度。光受体细胞中 cGMP 水平的变化直接影响 cGMP 闸门 Na^+ 通道的通透性。在黑暗的条件下，这些通道由于 cGMP 的结合而保持开启。在光诱导下，由于 cGMP 的磷酸化，导致 cGMP 的浓度降低，使得 cGMP 闸门 Na^+ 通道关闭，膜两侧的膜电位超极化(hyperpolarization)，从而将光信号转变成了神经冲动，完成光信号的传递。

5.3.1.3 PKG

cGMP 的靶蛋白是 cGMP 依赖性蛋白激酶 G。它是一种二聚体，含有一个催化亚基和一个同 cGMP 结合的调节亚基。它作用的底物有：组蛋白（H1, H2A, H4）、磷酸化酶激酶、糖原合成酶、丙酮酸激酶、激素敏感性脂肪酶和胆固醇脂水解酶等。

5.3.2 受体酪氨酸激酶/Ras 途径

受体酪氨酸激酶（receptor tyrosine kinase），简称 RTK，是具有酪氨酸激酶活性的受体；Ras 是原癌基因 c-*ras* 表达的产物，RTK/Ras 是目前研究得比较清楚的一条主要的信号转导途径。

5.3.2.1 受体的结构特点及类型

受体酪氨酸激酶既是受体，又是酶，它能够同配体结合，并将靶蛋白的酪氨酸残基磷酸化。

酪氨酸激酶主要是控制细胞的生长与分化，所以此类受体与生长因子有关。所有的 RTK 都是由 3 个部分组成的：含有配体结合位点的细胞外结构域、单次跨膜的疏水 α 螺旋区、含有 RTK 活性的细胞内结构域（图 5-54）。

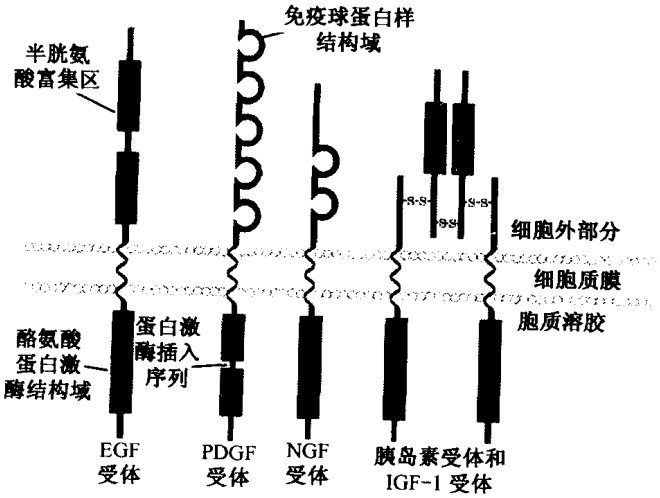


图5-54 几种主要的受体酪氨酸激酶(引自 Voet *et al.*, 1995)

已发现 50 多种不同的 RTK，主要的几种类型包括：①表皮生长因子（epidermal growth factor，EGF）受体；②血小板生长因子（platelet-derived growth factor，PDGF）受体和巨噬细胞集落刺激因子（macrophage colony stimulating factor，M-CSF）受体；③胰岛素（insulin）和胰岛素样生长因子 1（insulin-like growth factor1，IGF1）受体；④神经生长因子（nerve growth factor，NGF）受体；⑤成纤维细胞生长因子（fibroblast growth factor，FGF）受体；⑥血管内皮生长因子（vascularendothelial growth factor，VEGF）受体和肝细胞生长因子（hepatocyte growth factor，HGF）受体等。

5.3.2.2 受体酪氨酸激酶的激活

受体酪氨酸激酶的激活是一个相当复杂的过程，大多数受体都要先由两个单体形成一个二聚体，并在细胞内结构域的尾部磷酸化，然后在二聚体的细胞内结构域装配成一个信号转导复合物（图 5-55）。

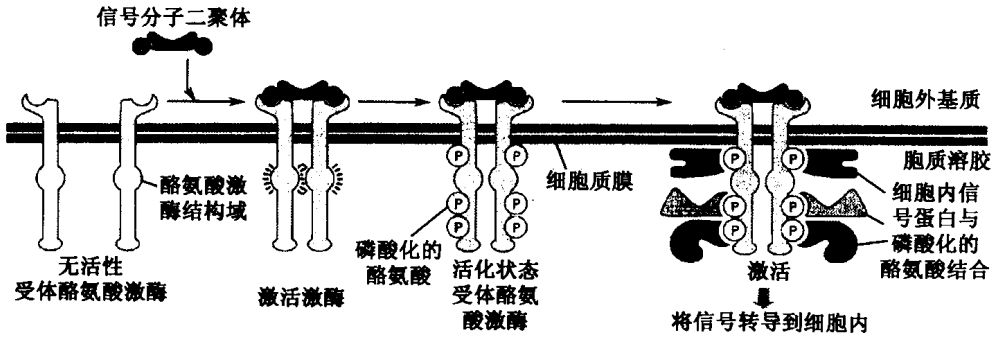


图 5-55 受体酪氨酸激酶的激活及细胞内信号转导复合物的形成

（引自 Alberts *et al*.，1998）

信号分子与 RTK 的细胞外结构域结合，导致受体形成二聚体。图中所示的信号分子本身是一个二聚体，因此可以将两个受体分子交联起来。如果信号分子不是二聚体，受体同信号分子结合后要通过构型的变化形成受体二聚体。由于受体形成二聚体，将两个受体细胞内激酶结构域靠近在一起并相互接触而激活。被激活的激酶可以相互将酪氨酸残基磷酸化，每个磷酸化位点都可作为细胞内特异的信号蛋白的结合位点，进行信号转导。

酶联受体的细胞外结构域与信号分子结合后，要行使信号转导作用，就必须打开细胞内结构域的酶活性开关。由于酶联受体是单次 α 螺旋跨膜，所以它必须通过特殊的信号转导机制，将外部信息传递到细胞内。

受体酪氨酸激酶在没有同信号分子结合时是以单体存在的，并且没有活性；一旦有信号分子与受体的细胞外结构域结合，两个单体受体分子在膜上形成二聚体；两个受体的细胞内结构域的尾部相互接触，激活它们的蛋白激酶，结果使尾部的酪氨酸残基磷酸化。磷酸化导致受体细胞内结构域的尾部装配成一个信号传导复合物（signaling complex）：磷酸化的酪氨酸部位立即成为细胞内信号传导蛋白（signaling protein）的结合位点，可能有 10～20 种不同的细胞内信号蛋白同受体尾部磷酸化部位结合后被激活。信号复合物通过几种不同的信号转导途径，扩大信息，激活细胞内一系列的生化反应；或者将不同的信息综合起来引起细胞综合性应答（如细胞增殖）。

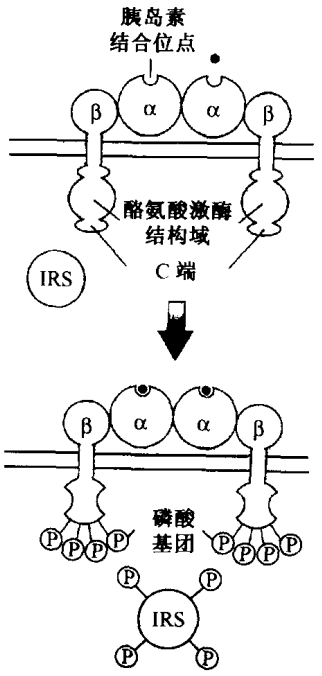


图 5-56 胰岛素受体与配体结合反应（引自 Karp, 1996）

不同的 RTK 将细胞内的信号蛋白会聚成不同的群体，产生不同的效应。但是，有些参与信号转导的蛋白（酶）不限于某一途径，如磷脂酶 C 既参与磷脂酰肌醇途径的信号转导又参与 RTK 的信号转导，作用方式都一样，只不过构型不同：参与磷脂酰肌醇信号转导的是磷脂酶 C_β，而参与 RTK 信号转导途径中是磷脂酶 C_γ。RTK 信号转导的主要途径是将受体接收的信号传递到细胞核。但是，因突变而激活的 RTK 信号转导将会导致细胞不适当的分裂，这已成为许多癌症发生的主要因素。

5.3.2.3 胰岛素受体信号转导途径

受体结构与激活

胰岛素受体（insulin receptor）是一个四聚体，由两个 α 亚基和两个 β 亚基通过二硫键连接。两个 α 亚基位于细胞质膜的外侧，其上有胰岛素的结合位点，两个 β 亚基是跨膜蛋白，起信号转导作用。无胰岛素结合时，受体的酪氨酸蛋白激酶没有活性。当胰岛素与受体的 α 亚基结合并改变了 β 亚基的构型后，酪氨酸蛋白激酶才被激活，激活后可催化两个反应：①使四聚体复合物的另一个 β 亚基中特异位点的酪氨酸残基磷酸化，这种过程称为自磷酸化（autophosphorylation）；②使胰岛素受体底物（insulin receptor substrate, IRS）上具有重要作用的十几个酪氨酸残基磷酸化（图 5-56），磷酸化的 IRS 能够结合并激活下游效应物。

IRS 在被胰岛素受体磷酸化以后，如同一块“磁铁”与那些具有 SH2 结构域的蛋白结合，根据所结合蛋白的具体结构产生不同的效应，如激活 SH2 蛋白的酶活性、改变蛋白质构型并同别的蛋白质结合或者引起蛋白质从细胞的一个部位转移到另一个部位。

SH 结构域

值得注意的是受体酪氨酸激酶并非将底物的所有酪氨酸残基都进行磷酸化，仅仅只将那些存在于被称之为磷酸酪氨酸基序（phosphotyrosine motif）的氨基酸序列中的酪氨酸磷酸化。研究发现，许多参与细胞信号转导的蛋白质中含有 SH 结构域（SH domain），这种结构域与磷酸酪氨酸基序中磷酸化了的酪氨酸具有高亲和力，而与那些没有磷酸化的磷酸酪氨酸基序中的酪氨酸很少或没有亲和力。

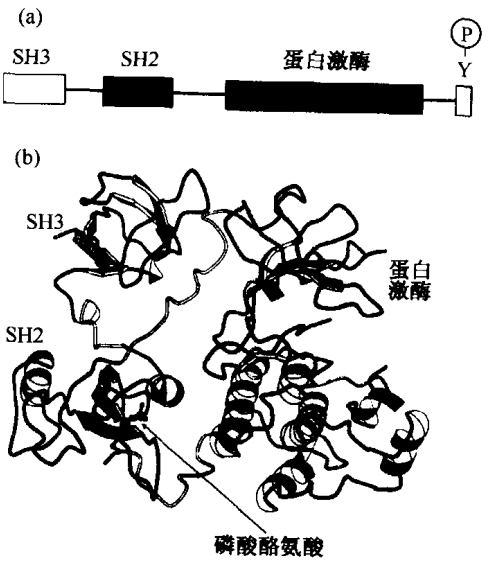


图5-57 Src 蛋白结构(引自 Berg *et al.*, 2002)
(a)细胞的 Src 蛋白含有一个 SH2结构域、一个 SH3结构域、一个蛋白激酶结构域和一个具有关键酪氨酸残基的羧基端的尾；(b)c-Src 无活性时的结构。

SH结构域是“Src同源结构域”（Src homology domain）的简称（*Src*是一种癌基因，最初在Rous肉瘤病毒中发现）。这种结构域能够与受体酪氨酸激酶磷酸化残基紧紧结合，形成多蛋白的复合物进行信号转导。

SH2结构域大约由100个氨基酸组成，能够与生长因子受体（如PDGF和EGF）自我磷酸化的位点结合。

含有SH2结构域的蛋白也常常含有SH3结构域（图5-57）。SH3结构域最初也是在Src中鉴定到的由50个氨基酸组成的组件，后来在其他一些蛋白质中也发现了SH3结构域。SH3能够识别富含脯氨酸和疏水残基的特异序列的蛋白质并与之结合，从而介导蛋白与蛋白相互作用。

目前至少发现两类与SH3结合的配体。第一类是含PXLPPZP保守序列的蛋白质（其中X是任何氨基酸，Z是SH3中特有的）；第二类是含有XPPLPXR保守序列的蛋白质。

由此看来，尽管G蛋白偶联信号转导与受体酪氨酸蛋白激酶的信号转导在机制有很大不同，但是二者间仍有许多相似的地方：在G蛋白偶联途径，通过G蛋白构型的变化将细胞外信号传递到细胞内，而在RTK途径，通过受体酪氨酸磷酸化将细胞外基质信号传递到细胞内。具有SH2结构域的蛋白质是RTK的效应物，相当于G蛋白偶联系统中的腺苷酸环化酶或磷脂酶C。

信号转导机制

一旦胰岛素受体被激活、IRS被磷酸化后，磷酸化的IRS可以作为一个锚定位点，将许多不同但都具有SH2结构域的蛋白锚定在一起，这些被锚定的蛋白可激活不同的信号转导途径（图5-58），由此将胰岛素受体接受的细胞外信号通过不同的途径传递到细胞内。

已知有3种胰岛素受体酪氨酸激酶作用的底物（IRS）：第一种是胰岛素受体底物1（IRS1），是一种蛋白质，其上有多个（至少8个）可被受体激酶磷酸化的位点，磷酸化后可同多种效应物结合，包括：PI（3）K、Syp（一种磷酸酪氨酸磷酸酶）、Nck（一种连接蛋白）、Grb2，一种通过SH2同磷酸化的酪氨酸结合的连接蛋白；第二种是Shc（是通过cDNA克隆筛选到的编码SH结构域的基因的蛋白产物），也是一种连接蛋白。Shc的酪氨酸被磷酸化后能够同GRB2结合，然后激活Ras，触发细胞的增殖；第三种底物是IRS2。IRS2的酪氨酸被磷酸化后能够同磷脂酰肌醇-3-激酶结

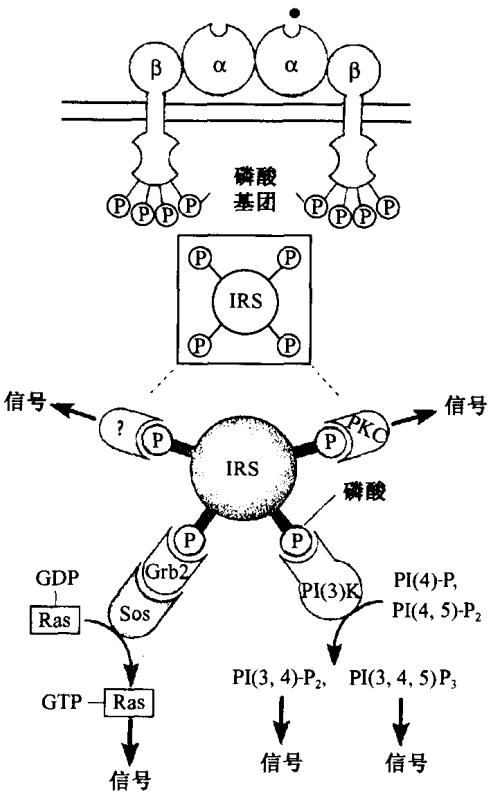


图5-58　酪氨酸磷酸化的IRS在激活信号转导途径中的作用（引自Karp，1996）

激活的胰岛素受体将IRS磷酸化，被磷酸化的IRS可激活PI（3）K、PI-PLC和Ras途径。

合，将该酶激活，并影响磷脂的代谢。

从机制上看，受体酪氨酸激酶信号转导途径对信号的转导是通过磷酸化的酪氨酸与 SH2 或 SH3 的相互作用与结合实现的。IRS 通过磷酸化的酪氨酸与效应物的 SH2 或 SH3 相互作用，将效应物激活。虽然各种 SH2 都能同磷酸化的酪氨酸结合，并且不同的 SH2 结构域在结构上非常相似，但 SH2 同磷酸化的酪氨酸的结合还是有一定的特异性，不同的 SH2 能够识别特异区域的磷酸化酪氨酸，这种选择性与 C 端 1～3 位的酪氨酸的磷酸化的关系特别大。SH2 结构域能否与磷酸化的酪氨酸结合，有时受 SH2 蛋白内部酪氨酸磷酸化的控制。在这种情况下，SH2 蛋白内部磷酸化左右了 SH2 的行为，对信号转导产生极大的影响。

磷脂酰肌醇 3 -羟基激酶[PI(3)K]是胰岛素受体信号转导途径中能够与磷酸化的 IRS1 结合的含有 SH2 的效应物，该酶催化磷酸基团添加到磷脂酰肌醇（PI）糖环的 3′-羟基上，生成两个产物：$PI(3,4)P_2$和 $PI(3,4,5)P_3$，这两种产物都参与磷脂酰肌醇的信号转导。在胰岛素信号转导途径中，PI(3)K 能够与不同的靶蛋白结合，并将靶蛋白激活，引起不同的反应：①帮助葡萄糖胺跨膜运输；②增强与胰岛素相关蛋白的合成；③刺激糖原的合成，将葡萄糖胺转变为糖原。

胰岛素样生长因子信号

胰岛素样生长因子有两种类型：胰岛素样生长因子 1（insulin-like growth factor 1，IGF1）和胰岛素样生长因子 2（insulin-like growth factor 2，IGF2）。在信号转导机制上与胰岛素信号转导有两个共同的特点：涉及胰岛素受体底物 1（IRS1）以及在细胞内将信号分成不同的途径产生不同的影响。胰岛素是在内质网上合成的，通过内膜的加工运输分泌到细胞外。成熟的胰岛素是由两条肽链通过二硫键形成的二聚体，总共 51 个氨基酸。IGF1 和 IGF2 都是一条肽链，分别含有 67 和 70 个氨基酸残基。这两种生长因子在序列上与胰岛素高度同源。它们除了具有胰岛素的代谢作用之外，IGF1 和 IGF2 还具有促进分裂的作用。胰岛素受体和 IGF1 受体的结构相似，但是结合位点不同，它们能够特异性的结合各自的信号分子。IGF2 的受体却非常不同，只有一条肽链，其细胞内结构域很小，且没有酪氨酸激酶的活性。胰岛素受体和 IGF1 受体在许多细胞中都有表达，而 IGF2 受体只是存在于胎儿细胞。

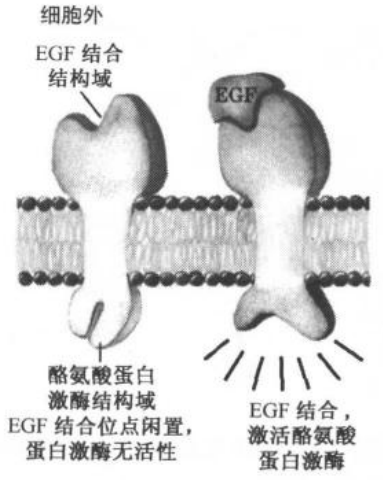


图 5-59　EGF 受体结构示意图
（引自 Nelson *et al*., 2000）

5.3.2.4　表皮生长因子受体信号转导途径

大多数 RTK 是由一条肽链组成的，并以单体存在于没有激活的细胞中，只是与配体结合后两个单体才相互作用形成二聚体。表皮生长因子受体是研究得比较清楚的酪氨酸激酶受体，它同其他生长激素受体一样，存在于特殊的靶细胞的质膜上（图 5-59），调节不同的功能，包括细胞的生长、增殖和分化，并且与肿瘤的发生有关。

表皮生长因子是一种小肽（53 个氨基酸残基），能够广泛促进细胞的增殖。EGF 是类 EGF 大家族的一个成员。EGF 同应答细胞表面的特异受体结合，一旦结

合，便促进受体二聚化并使细胞质位点磷酸化。被激活的受体至少可与 5 种具有不同信号序列的蛋白结合，进行信号转导。

受体结构　EGF 受体是一种糖蛋白，广泛分布于哺乳动物的上皮细胞、人的成纤维细胞、角质细胞等。EGF 受体是一条含有 1 186 个氨基酸残基的多肽链，分子质量为 170kDa，由 3 个部分组成：①细胞外结构域约有 621 个氨基酸残基，富含半胱氨酸（51 个），并形成多对二硫键，其上结合有糖基，是 EGF 结合的位点；②跨膜区由 23 个氨基酸残基组成；③细胞质结构域由 542 个氨基酸残基组成，含有无活性的酪氨酸激酶和几个酪氨酸磷酸化的位点。

受体激活　当 EGF 同受体细胞外结构域结合位点结合后，受体被激活导致两个 EGF 受体单体形成二聚体，激活细胞质部分的酪氨酸激酶，使酪氨酸自我磷酸化。EGF 受体上有 5 个主要的磷酸化的酪氨酸位点可以同几种不同的蛋白质结合，分别引起细胞内不同的信号应答。

级联反应　在多数情况下，EGF 受体被磷酸化的酪氨酸位点同靶蛋白（酶）的 SH2 结构域相互作用，将靶蛋白（酶）激活，引起细胞应答。如 PIP_2 激酶通过 SH2 与 EGF 受体磷酸化的酪氨酸位点相互作用被激活，激活的 PIP_2 激酶使一种膜脂——PIP_2 磷酸化。另外，磷酸化的酪氨酸位点也可以同具有 SH2 结构域的磷脂酶 C_γ 相互作用，并将磷脂酶 C_γ 激活，激活的磷脂酶 C_γ 可将质膜中 PIP_2 水解成 IP_3 和 DAG，引起与磷脂酰肌醇-G 蛋白偶联系统类似的信号转导。

5.3.2.5　Ras 蛋白的激活与信号转导

原癌基因 c-*ras* 表达产物 Ras 蛋白是目前研究得较为清楚的一条信号转导途径，其转导过程是：细胞外信号→受体→Ras→Raf1→ MEK→MAPK→转录因子→激活靶基因→细胞应答。

Ras 蛋白（Ras protein）

Ras 是大鼠肉瘤（rat sarcoma，Ras）的英文缩写。Ras 蛋白是原癌基因 *c-ras* 的表达产物，分子质量为 21kDa，属单体 GTP 结合蛋白，具有弱的 GTP 酶活性。Ras 蛋白的活性状

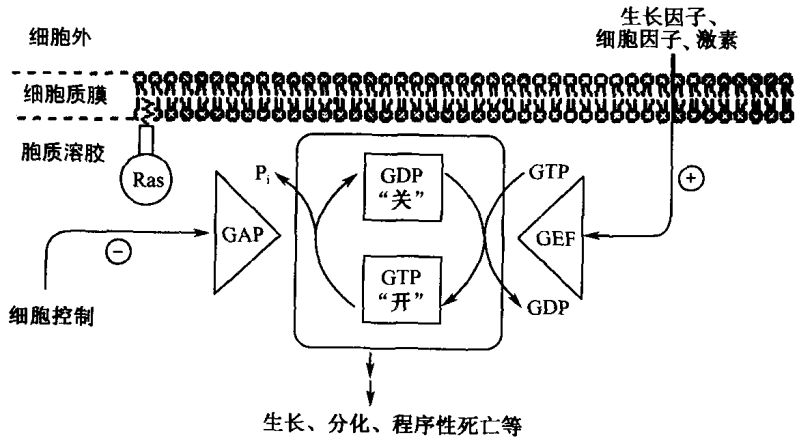


图 5-60　Ras 蛋白的活性调节（引自 Alberts *et al*., 1998）

Ras 蛋白的活性受 GEF 和 GAP 的控制，GEF 激活 Ras，而 GAP 则抑制 Ras 的活性。

态对细胞的生长、分化、细胞骨架、蛋白质运输和分泌等都具有影响，其活性则是通过与GTP或GDP的结合进行调节（图5-60）。

Ras的活性受两个主要蛋白的控制，一个是鸟苷交换因子（GEF），它的作用是促使GDP从Ras蛋白上释放出来，取而代之的是GTP，从而将Ras激活，GEF的活性受生长因子及其

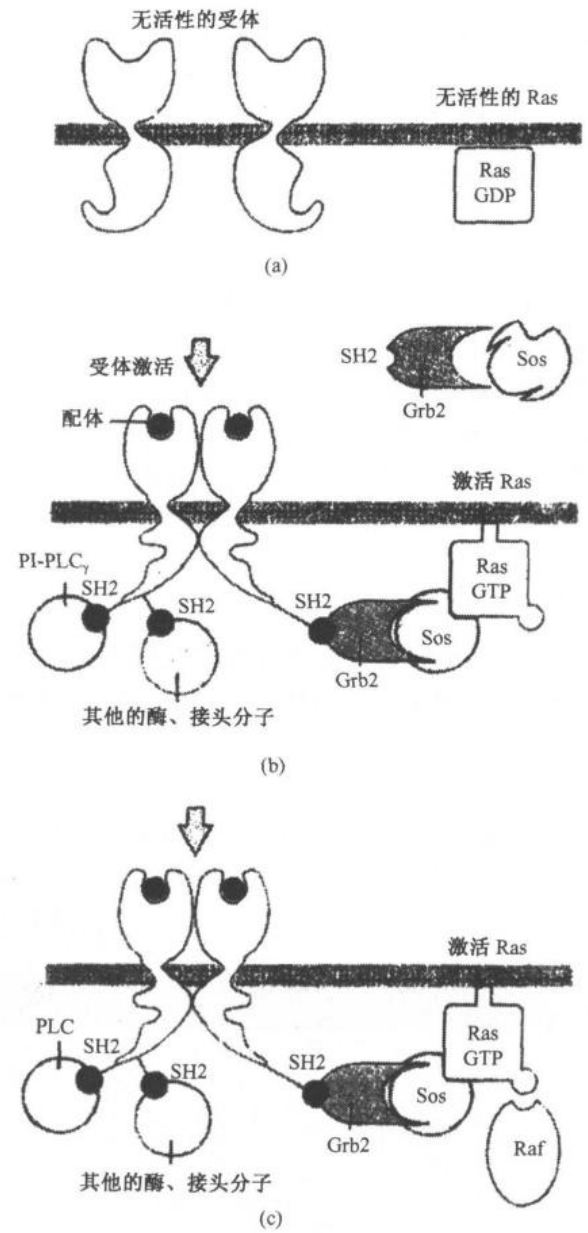


图5-61　RTK激活Ras的过程（引自Karp，1999）

（a）Ras在非活性状态时，RTK受体是以单体形式存在于质膜中，而Ras蛋白的鸟苷结合位点被GDP占据；（b）配体与受体结合，促使受体二聚化，并导致受体细胞质结构域的自我磷酸化，新形成的磷酸酪氨酸作为Grb2-Sos蛋白的结合位点，当Grb2-Sos蛋白与受体结合后可诱导Ras蛋白进行GTP与GDP交换；（c）GTP激活的Ras作为Raf的结合位点，将这种激酶定位到质膜上，激发MAP蛋白激酶级联系统。

受体的影响。另一个控制 Ras 蛋白活性的是 GTP 酶激活蛋白（GAP），该酶存在于正常细胞中，主要作用是激活 Ras 蛋白的 GTP 酶，将结合在 Ras 蛋白上的 GTP 水解成 GDP，成为失活型的 Ras 蛋白-GDP。所以在正常情况下，Ras 蛋白基本上都与 GDP 结合在一起，定位在细胞质膜内表面上。

Grb2 和 Sos 蛋白

Ras 蛋白的激活除了与生长因子、生长因子受体的活性状态相关之外，还涉及两个重要的蛋白：Grb2 蛋白和 Sos 蛋白（图 5-61）。

Grb2 蛋白（growth factor receptor-bound protein 2）是生长因子受体结合蛋白 2，又叫 Ash 蛋白。该蛋白参与细胞内各种受体激活后的下游调节。它能够直接与激活的表皮生长因子受体磷酸化的酪氨酸结合，参与 EGF 受体介导的信号转导，也能通过与 Shc 磷酸化的酪氨酸结合间接参与由胰岛素受体介导的信号转导。Grb2 能够同时与 Shc、Sos 结合形成 Shc-Grb2-Sos 复合物，并将 Sos 激活，激活的 Sos 与质膜上的 Ras 蛋白结合，并将其激活，引起信号级联反应。

Sos 蛋白是编码鸟苷释放蛋白的基因 *sos* 的产物（sos 是 son of sevenless 的缩写）。Sos 蛋白在 Ras 信号转导途径中的作用是促进 Ras 释放 GDP，结合 GTP，使 Ras 蛋白由非活性状态转变为活性状态。因此，Sos 蛋白，是一种鸟苷交换因子，是 Ras 的激活蛋白。

Grb2 蛋白含有一个 SH2 结构域和两个 SH3 结构域，属 SH 蛋白。而 Sos 蛋白不含 SH 结构域，不属于 SH 蛋白。

Ras 蛋白的激活

当 EGF 激活其受体后，受体细胞质结构域磷酸化，新的磷酸化位点作为 Grb2-Sos 蛋白结合部位。Grb2-Sos 蛋白同受体的磷酸化位点结合之后，Sos 蛋白被激活，并促进 Ras 蛋白进行 GDP 与 GTP 的交换，从而将 Ras 蛋白激活。

Ras 蛋白也可被胰岛素受体激活，其激活机制稍有不同。在胰岛素受体途径，Grb2-Sos 蛋白不能直接与受体细胞质结构域的磷酸酪氨酸位点结合，而是同胰岛素受体底物 Shc 结合，形成 Shc-Grb2-Sos 蛋白复合物。

生长因子信号经 Ras 的级联反应

Ras 蛋白被激活后，通过激酶级联系统进行信号转导，其总的过程是：生长因子与相应的受体结合导致受体二聚化，并引起细胞质结构域的酪氨酸自我磷酸化。磷酸酪氨酸作为 Grb2 蛋白的 SH2 结构域的结合位点同 Grb2 蛋白结合。Grb2 通过两个 SH3 结构域与 Sos 蛋白结合并将 Sos 激活。激活的 Sos 同结合在质膜中的非活性状态的 Ras 作用，促使 Ras 蛋白结合的 GDP 释放，结合上 GTP。在此过程中，Grb2 蛋白起连接蛋白的作用，将激活的受体与 Ras 连接起来。Ras 蛋白激活后能够与 Raf 蛋白结合。Raf 蛋白是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，又称为 MAPKKK。Raf 能够磷酸化 MEK 蛋白激酶（MEK 又称为 MAPKK），MEK 则磷酸化 MAPK（促分裂原活化蛋白激酶）。激活后的 MAPK 进入细胞核内使一些转录因子磷酸化，如 Fos、Jun、Myc 等。磷酸化的转录因子与 DNA 结合的亲和力大大增加，增强了特异基因的转录（图 5-62）。

Ras 蛋白处于活化状态的时间很短，大约 30min，其内在的 GTP 酶活性很快使其恢复到非活性状态。Ras 信号转导的解除主要是通过特异磷酸酶将被磷酸化激活的激酶中的磷酸基

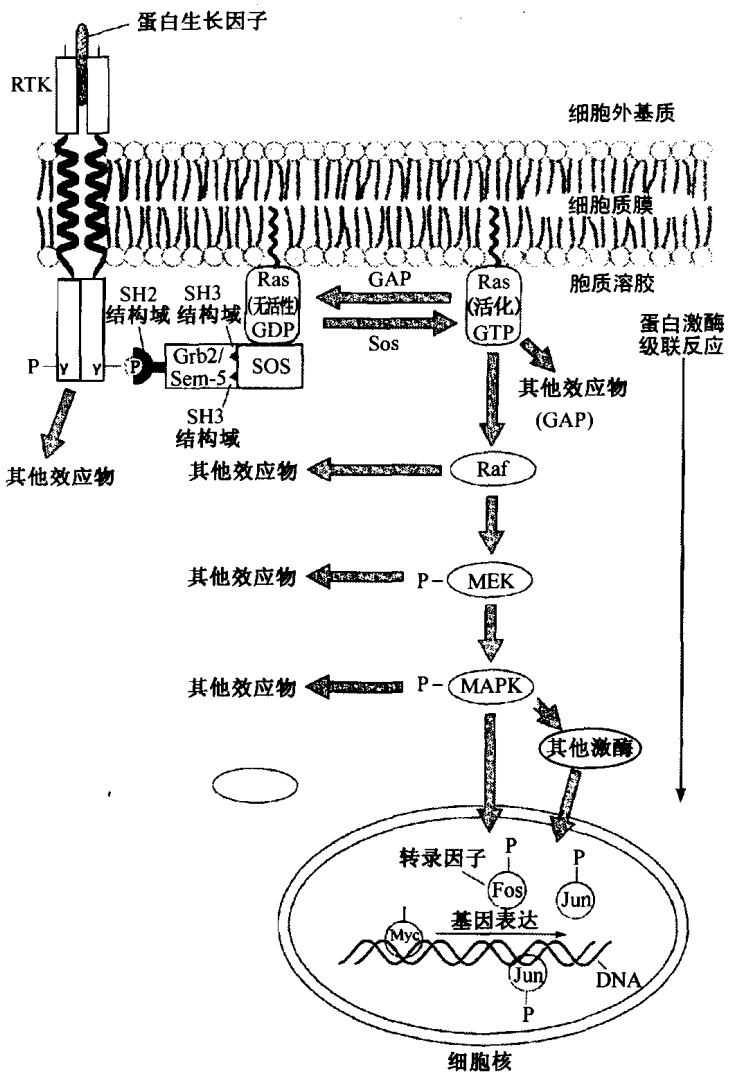


图 5-62　Ras 信号转导级联系统（引自 Voet *et al*., 1995）

团除去。

Ras 信号转导途径与细胞的生长分裂有相当大的关系，并且与细胞的癌变密切相关。已经发现参与 Ras 信号转导的许多蛋白或酶与癌的发生有关，有些参与癌基因的诱导表达。在 Ras 途径中，只要是与癌基因诱导表达有关的蛋白的突变，都会导致癌变。如 Ras 蛋白发生了变异，其构象随之改变，造成 GAP 不能识别和激活 Ras 蛋白的 GTP 酶活性，因此癌细胞中 Ras 蛋白既可与 GTP 结合，也可与 GDP 结合，这在总体上改变了细胞生长状况，使之异常增殖。

5.4　其他信号转导途径

上面讨论的 G 蛋白偶联系统、受体酪氨酸蛋白激酶以及离子通道偶联受体是研究得较为

清楚的信号转导途径。此外还有其他一些信号转导体系。

5.4.1 NO 的细胞信使作用

NO 是可溶性的有毒气体，这种气体居然能够作为细胞中的信号分子，的确使人感到惊讶。但研究表明，NO 分子具有多种生物学功能，并且是一种能够进入细胞直接作用于酶并引起快速反应的气体信号分子。在一些组织中作为局部介质引起信号转导，使血管壁的平滑肌细胞松弛，血液流通顺畅。

5.4.1.1 NO 的性质及形成

早在 1958 年，有人发现一种特别的突变鼠，这种突变鼠的吞噬细胞不能吞噬异常的细胞和细菌。用正常小鼠做实验，在细菌感染引起炎症的同时，分泌到尿液中氮的含量升高，而用突变小鼠做实验没有此反应。当时对于为什么炎症会引起尿液中氮含量提高的原因并不清楚。后来发现培养的巨噬细胞的杀菌作用与培养基中精氨酸有关。如果没有精氨酸，巨噬细胞就不能吞噬病原体。后来很快发现精氨酸是 NO 合酶（nitric oxide synthase）的底物（图 5-63），该酶能够将精氨酸氧化成 NO。这是第一次探明 NO 是一种重要的生物分子。

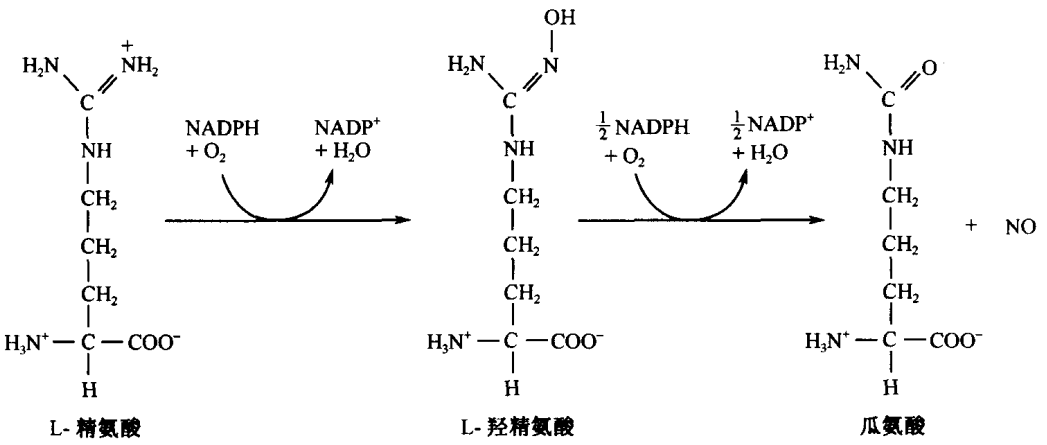


图 5-63 NO 合酶催化 NO 的形成

5.4.1.2 NO 的信使作用

NO 合酶是一种 CA^{2+}/钙调蛋白敏感性的酶，Ca^{2+}/钙调蛋白与 NO 合酶的结合可激活 NO 合酶的活性。因此任何使细胞内 Ca^{2+} 浓度提高的因素，如乙酰胆碱、谷氨酸、组胺等都有可能增强 NO 合酶的活性。

NO 的信使作用是通过对可溶性 GC 的激活，进而产生 cGMP 进行转导的。

研究表明乙酰胆碱同内皮细胞外表面结合后，使细胞质中 Ca^{2+} 浓度升高。Ca^{2+} 进入细胞质后，激活了 NO 合酶，激活的 NO 合酶利用精氨酸生成了 NO。NO 能够跨过细胞质膜扩散到邻近的平滑肌细胞，并将鸟苷酸环化酶激活，该酶催化 GTP 生成 cGMP。cGMP 是非常重

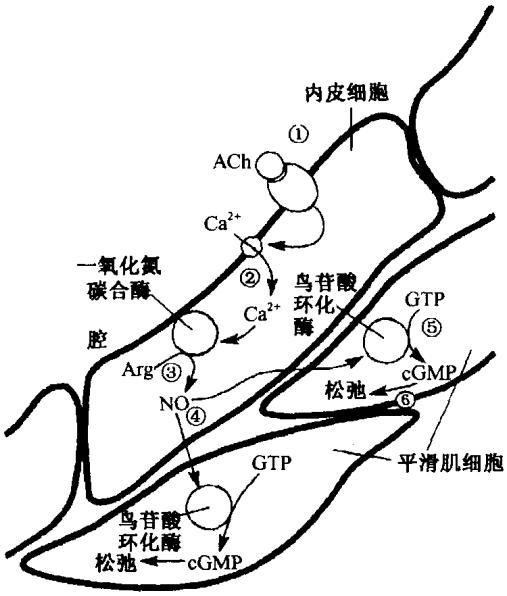


图 5-64　NO 和 cGMP 的信号转导途径
（引自 Karp，1999）

要的第二信使，可引起肌细胞松弛和血管舒张反应（图 5-64）。由于 NO 的半衰期很短（5～10s），所以它只能作用于相邻细胞。

NO 对血管的效应可以很好地解释硝化甘油的作用，早在 100 多年前就使用硝化甘油处理心绞痛的病人（这种绞痛是由血液不适当地流向心肌引起的）。硝化甘油在体内转化成 NO，它可以使血管松弛。减轻心脏的工作压力，减少心肌对氧的需要。

5.4.2　整联蛋白介导的信号转导

正常组织的细胞与癌变组织的细胞的一个明显的差别就是，癌变组织的细胞能够在培养条件下不需细胞外基质成分就能附着到培养器皿上，而正常组织的细胞离体培养时，若不加细胞外基质成分则不能贴壁生长（图 5-65）。另外正常细胞在悬浮培养中也不能分裂，因为正常细胞需要互相接触，相互传递生长和分裂的信号。所以细胞与细胞的识别和黏着、细胞与细胞外基质的相互作用不仅是组织分化的需要，也是信号转导的重要途径。

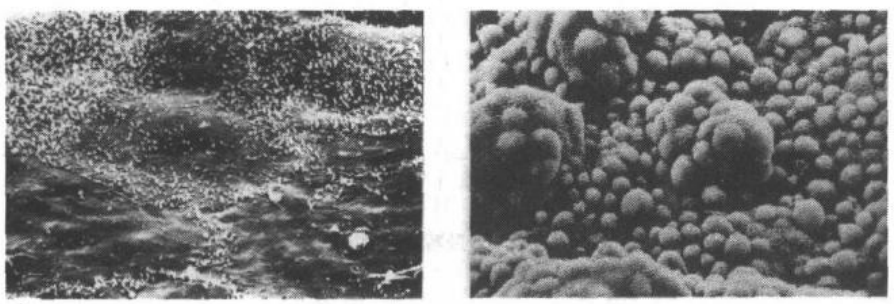


图 5-65　细胞外基质蛋白与细胞分化状态维持（引自 Karp，1999）
（a）将从小鼠腺体分离的细胞培养在没有细胞外基质的培养基中时，细胞不能进行正常的分裂，并且漂浮，丧失合成乳蛋白的能力。（b）在培养基中补充细胞外基质后，细胞恢复正常的分化能力，开始合成乳蛋白。

在细胞外基质成分引起的信号转导中，整联蛋白起重要作用。如整联蛋白与配体的结合，能够诱导细胞内发生各种应答，包括改变细胞质 pH、Ca^{2+} 的浓度、蛋白质磷酸化以及基因表达。这些变化反过来会改变细胞的生长态势、迁移活性、分化状态以及生存能力。

5.4.2.1　通过黏着斑由整联蛋白介导的信号转导

通过整联蛋白与细胞外基质间的相互作用形成的黏着斑不仅具有细胞的机械连接作用，

同时具有信号转导作用。

通过黏着斑由整联蛋白介导的信号转导有以下两个通路。

启动基因的表达

这条通路主要是启动一些基因的表达。黏着斑中一些与信号转导相关的关键蛋白与受体酪氨酸激酶途径是相同的，其信号转导途径也很相似。整联蛋白与细胞外基质的相互作用能够激活一些细胞质中的蛋白激酶，如 Src。Src 被整联蛋白激活后，能够将一些蛋白质磷酸化，其中一种是酪氨酸蛋白激酶，称作黏着斑激酶（focal adhesion kinase，FAK）。当 Src 磷酸化 FAK 时，在 FAK 分子中形成一个磷酸酪氨酸，可作为接头蛋白 Grb2 的 SH2 结构域的结合位点。Grb2 与 FAK 结合后能够激活 Ras 蛋白，将信号沿 MAP 激酶途径进行转导。信号最后进入细胞核，激活与生长和增殖相关基因的转录（图 5-66）。这就是细胞通过表面的接触导致细胞增殖的原因所在。

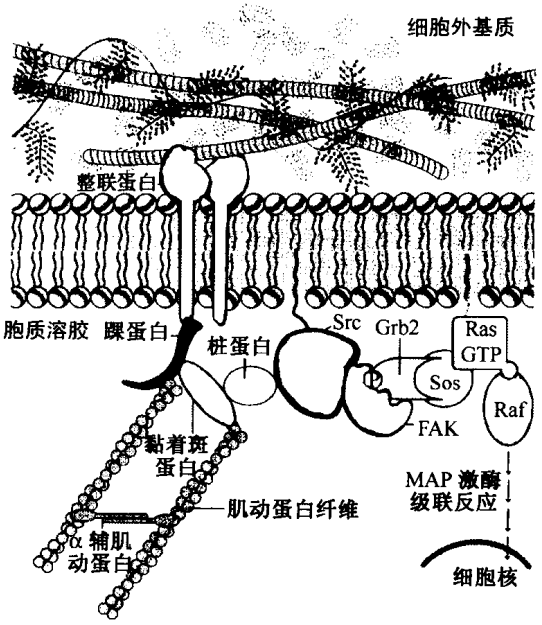


图 5-66　黏着斑的功能示意图

（引自 Karp，1999）

黏着斑具有两大功能：①通过肌动蛋白纤维形成的网络起机械结构的作用；②信号转导作用，详见正文。

促进某些蛋白质的合成

由黏着斑介导的信号转导不仅会启动基因的表达，也会影响细胞质的代谢和蛋白质合成。当黏着斑激酶 FAK 的酪氨酸残基被磷酸化后，与磷脂酰肌醇 3 -羟基激酶 PI（3）K 的 SH2 结构域结合；活化的 PI（3）K 催化产生两种磷脂酰胆碱衍生物：PI-3，4 -二磷酸和 PI-3，4，5 -三磷酸，两者作为膜结合信使活化激酶 $p70^{s6k}$，活化的 $p70^{s6k}$进而磷酸化核糖体小亚基的 S6 蛋白；含有磷酸化 S6 蛋白的核糖体被优先利用，翻译某些特异的 mRNA，合成新的蛋白质。

5.4.2.2　整联蛋白介导黏着斑装配的信号转导

黏着斑是相当复杂的大分子结构，其中包括细胞外成分、细胞质膜、胞质溶胶蛋白以及细胞骨架的肌动蛋白纤维。通过对黏着斑装配机制的研究发现，黏着斑的装配也是整联蛋白介导的信号控制的。

当质膜上的整联蛋白与细胞外基质中配体结合时就开始了黏着斑的装配。黏着斑装配的信号从整联蛋白传递到一个关键蛋白，叫做 Rho 蛋白。Rho 蛋白是一种小分子的 G 蛋白，在形态和结构上与 Ras 蛋白相似，实际上 Rho 蛋白与 Ras 蛋白同属 G 蛋白家族中的调节蛋白。如同 Ras，Rho 蛋白也是一种分子开关，决定信号沿哪一条途径传递。在黏着斑的装配中，信号转导主要是调节应力纤维的装配（图 5-67）。

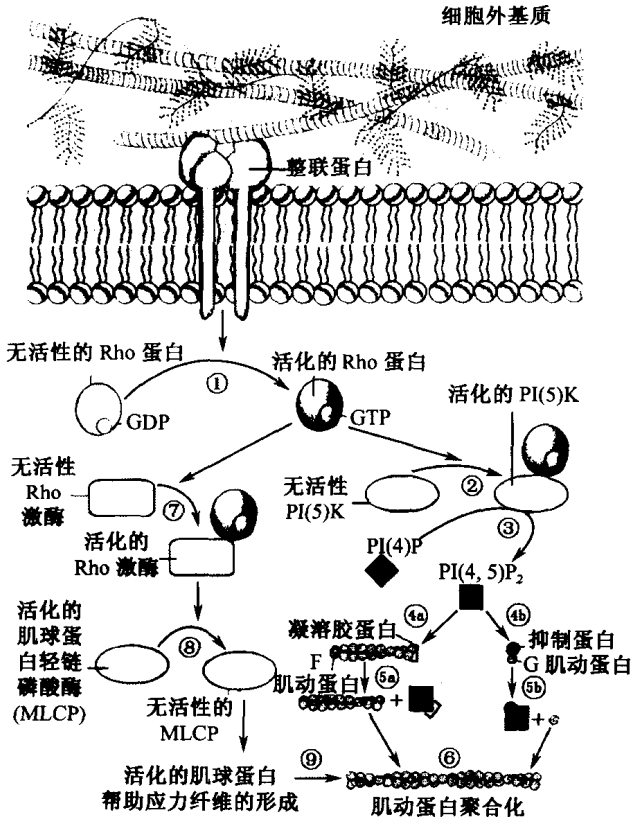


图 5-67　控制黏着斑中应力纤维装配的信号转导（引自 Karp, 1999）

配体与整联蛋白结合，使 Rho 蛋白中的 GDP 被 GTP 取代而激活；Rho-GTP 激活两条不同的信号转导途径：右边的途径是：Rho-GTP 激活磷脂酰肌醇 5 -激酶，缩写是 PI(5)K；PI(5)K 将磷酸基团转移给 PI(4)P 的 5′位，生成 PI(4, 5)P_2，PI(4, 5)P_2 能够与很多靶蛋白结合。图中所示，当 PI(4, 5)P_2 同凝溶胶蛋白(gelsolin)、抑制蛋白(profilin)结合时，促使它们与所结合的 F 肌动蛋白、G 肌动蛋白分离。G 肌动蛋白单体的释放可导致 F 肌动蛋白进一步聚合。在另一个途径(左)，Rho-GTP 同 Rho 激酶结合，使之激活，激活的激酶使 MLCP 失活。MLCP 的失活导致肌球蛋白的活化，从而促进应力纤维(肌动蛋白纤维)的装配。

5.5　信号的整合与终止

高等动植物细胞具有各种信号转导机制将细胞外的信号传递到细胞内，通过不同的转导途径做出不同的应答。实际上，细胞从环境中得到的不是单一的信号，细胞最后做出的应答也是综合性的。这就是说细胞要将来自细胞外的各种信息进行综合处理，包括信号的整合，最后做出综合性的反应。

另外，细胞不仅能够选择信号，而且能在做出应答后迅速解除信号的诱导作用，即终止信号作用。

5.5.1　信号的趋同、趋异与窜扰

我们分别讨论了主要的细胞表面受体及其介导的信号转导途径，看起来它们是通过各自

独立的途径将信号传递到靶位点，如促细胞分裂的信号途径是信号从细胞表面受体直接通向细胞核 DNA 的一种直线转导途径。实际上，细胞内的各种信号途径并非都是单一的通向某一方向而是相互转化的。信号在细胞内的转导过程是复杂的，因为不同的信号通路往往有交汇点，这势必给信号传递带来影响，有可能会聚起来共同作用于某一效应物，如 Ras 蛋白既能被来自胰岛素与胰岛素受体结合后传递的信号所激活，又能被 EGF 受体结合 EGF 后的信息所激活。有些细胞外的信号分子与受体结合后，不仅仅引起一种应答，而是有可能激活许多不同的效应物，引起细胞的不同反应，如胰岛素与受体结合后，可激活 3 种不同的胰岛素受体底物，激活不同的信号转导途径。另外，不同的途径除了能够作用于同一效应物，也有可能起相反的作用，如一种信号对某一效应物起激活作用，而来自另一途径的信号对同一效应物起抑制作用。也就是说细胞的信号转导的机制是相当复杂的，外来的信号有可能会聚后相互协作，共同作用于同一效应物，但也有可能起抑制作用。细胞信号转导各途径的这些关系可分为 3 大类：信号趋同（会聚）、信号趋异和窜扰，图 5-68 总结了细胞信号转导的这些特点。

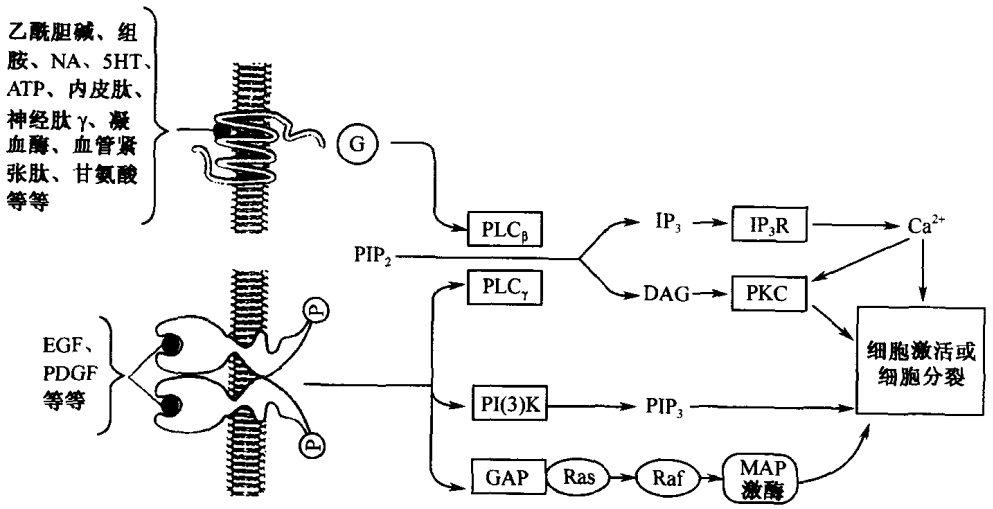


图 5-68　不同信号转导途径的趋同、趋异和窜扰（引自 Karp, 1999）

以异源 G 蛋白偶联受体和受体酪氨酸激酶的信号转导途径为例说明各信号转导的相互作用。这两种途径通过激活不同的磷脂酶 C 异构体趋同到一起，产生相同的第二信使 IP_3 和 DAG。由 EGF 或 PDGF 激活的受体酪氨酸激酶的信号沿 3 条不同的信号转导途径传递，即趋异转导。由 IP_3 的激活作用释放的 Ca^{2+} 不仅激活蛋白激酶 C，也可以激活其他一些蛋白，包括促细胞分裂相关的蛋白和蛋白激酶，这就是不同信号转导途径间的窜扰。

5.5.1.1　信号转导途径的趋同

信号转导途径的趋同（convergence）是指不同的信号分子分别作用于不同的受体，但是最后的效应物是相同的。如胰岛素和表皮生长因子分别作用于不同的受体系统，但是受体的细胞内结构域磷酸化后的位点都可作为 SH2 的锚定位点，换句话说，凡具有 SH2 结构域的蛋白既能同胰岛素受体的磷酸化部位结合也能同 PDGF 受体的磷酸化部位结合，实际上，通过 SH2 将这两种不同受体所接收的信号整合到一起。

我们所讨论过的与信号转导有关的细胞表面受体有 4 种类型，即离子通道偶联受体、G 蛋白偶联受体、酶联受体和整联蛋白受体。在这些受体中，有 3 种类型的受体的信号转导涉及 Grb2-Sos 复合物（图 5-69）。虽然这三种类型受体结合的细胞外的配体不同，但是它们都能够形成磷酸酪氨酸位点，锚定具有 SH2 结构域的接头蛋白 Grb2，然后通过 Sos 激活 Ras，激活的 Ras 通过激活 MAP 激酶的级联系统进行信号转导。其结果，将不同受体结合的信号会聚起来，引起靶细胞中一套相同的、促进细胞分裂的基因转录和翻译。

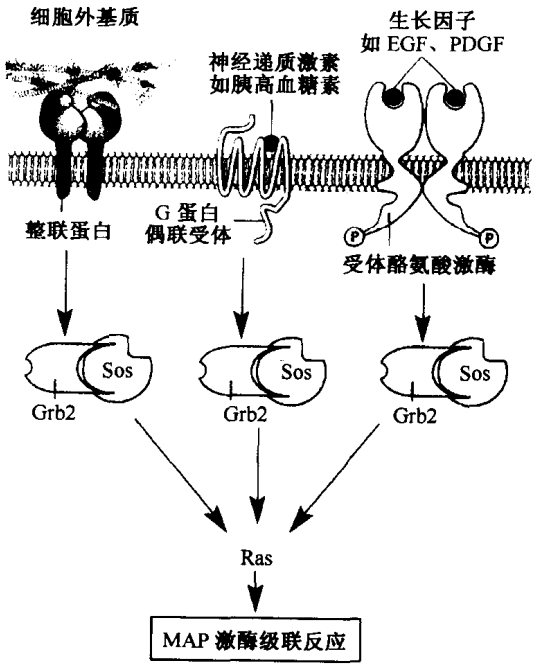


图 5-69　信号的趋同（引自 Karp，1999）
图中所示是将来自 G 蛋白偶联受体、整联蛋白、受体酪氨酸激酶的信号通过 Grb2-Sos 会聚到 Ras，然后沿着 MAP 激酶级联系统进行传递。

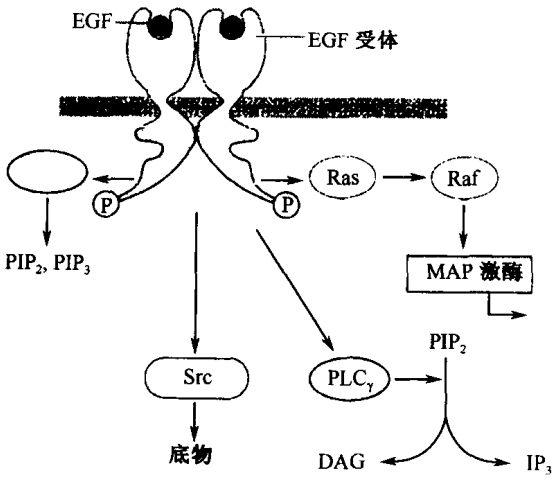


图 5-70　来自于 EGF 受体的信号能够分成几个不同的途径进行传递（引自 Karp，1999）

5.5.1.2　信号趋异

信号趋异（divergence）是指同一种信号与受体作用后在细胞内分成几个不同的信号途径进行传递，最典型的是受体酪氨酸激酶的信号转导（图 5-70）。

在 EGF 受体酪氨酸激酶信号转导中，EGF 与受体结合后导致受体细胞内结构域特定部位的酪氨酸自我磷酸化，形成磷酸酪氨酸。新形成的磷酸酪氨酸作为 SH2 结构域的锚定位点，将具有 SH2 结构域的不同效应物激活。由于这些效应物自身的功能不同，因而引起不同的信号转导。如 Grb2 作为接头蛋白将信号经 Sos 蛋白传给 Ras，引起 MAP 激酶的级联系统的信号转导。另一种具有 SH2 结构域的效应物是磷脂酶 C_γ，通过 SH2 与磷酸酪氨酸结合并被激活后可使 PIP_2 水解产生两种第二信使，通过与 Ras 不同的信号转导途径进行信号转导。另外，PI(3)K 和 Src 也是具有 SH2 结构域并能被 EGF 磷酸酪氨酸激活的效应物，但是引起的信号转导途径不同。

5.5.1.3 信号转导途径间的窜扰

信号转导途径间的窜扰（crosstalk），是指不同信号转导途径间的相互影响。由于细胞是生命体，不同信号转导途径的相互影响是灵活多变的，所以用窜扰更为形象、更具内涵。

在所讨论过的信号转导中，虽然每种体系都有自己相对独立的系统，似乎互不影响，如 PKA 系统、受体酪氨酸激酶系统。实际上细胞内的各种信息往往要交织在一起形成一个信息网共同起作用。例如 cAMP 的信号通路主要是引起细胞代谢活动的变化，特别是糖的代谢。新的研究结果表明，cAMP 也能抑制一些细胞的生长，包括成纤维细胞和脂肪细胞，机制主要是阻断 MAP 激酶级联系统（图 5-71）。

另外一个例子是 Ca^{2+} 和 cAMP 都是第二信使，Ca^{2+} 既能够激活腺苷酸环化酶（合成 cAMP），又能激活 cAMP 磷酸脂酶（降解 cAMP）。反过来，依赖于 cAMP 的蛋白激酶能够使 Ca^{2+} 通道磷酸化，改变对 Ca^{2+} 释放的能力。

还有些蛋白质，包括转录因子 CREB、糖原合成酶、磷酸酶激酶以及在糖代谢中起重要作用的酶类都能被依赖于 cAMP 的蛋白激酶和依赖于 Ca^{2+}-钙调蛋白激酶磷酸化，这些都说明细胞的各种信号途径是相辅相成的，绝对不是孤立的。

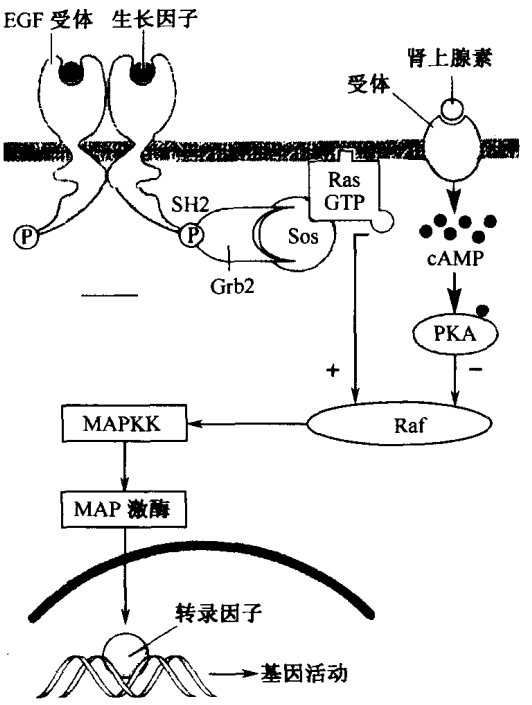


图 5-71 两个主要信号转导途径间的窜扰
（引自 Karp, 1999）
在某些细胞中，G 蛋白偶联系统的受体在肾上腺素等细胞外信使的作用下，产生第二信使 cAMP，cAMP 激活 PKA，然后通过 PKA 抑制 Raf，从而阻断了从 Ras 到 Raf 的信号转导。

5.5.2 信号终止

如果细胞持续地接收某种信号刺激就会导致细胞生命活动的失常，包括代谢的紊乱、持续分裂、癌变等，因此，细胞在接收信号之后必须迅速将信号解除或终止（termination），这对于维持细胞的正常生命活动是非常重要的。

前面已经介绍过 cAMP、IP_3、DAG 和 Ca^{2+} 等特殊信号的解除，下面讨论信号解除的一般规律。

5.5.2.1 信号分子水解

终止信号的最好方式是直接将信号分子水解，如乙酰胆碱酯酶既存在于突触也存在于肌细胞的质膜上，它能将乙酰胆碱水解。前面讨论过的 cAMP、IP_3 和 DAG 的信号解除主要是

通过水解或磷酸化而实现的。

5.5.2.2 受体钝化

当细胞持续暴露于细胞外信号时，某种信号分子的特异受体常常会快速钝化，如果钝化的受体只是那些已与信号分子结合的受体，这种现象称为同源钝化（homologous desensitization），钝化是通过磷酸化介导的（图 5-72）。如肾上腺素与受体结合时，受体可在β肾上腺素受体激酶的作用下发生磷酸化，β抑制蛋白与磷酸化的受体结合使之钝化，失去受体作用；此外，β肾上腺素受体也可通过 cAMP 依赖的蛋白激酶 A 磷酸化钝化。这种钝化称为异源钝化（heterologous desensitization），因为钝化是通过不同受体途径的酶进行的。

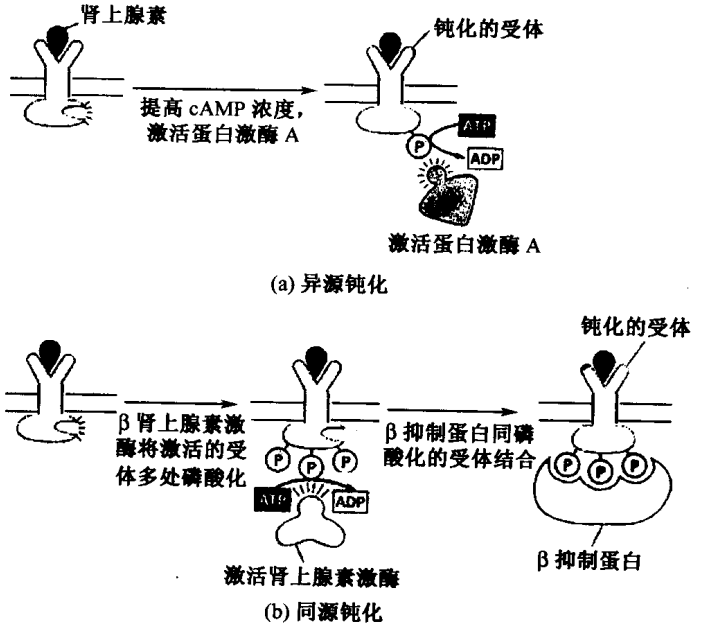


图 5-72 肾上腺素受体通过磷酸化钝化的两种机制（引自 Alberts *et al.*, 1994）

异源钝化不仅仅只有受体自身直接失活这一种方式，在某种情况下，信号分子也可以通过改变 G 蛋白，使其失去信号转导作用。例如，成纤维细胞的 PGE 受体通过 Gs 和 AC 激活 cAMP 途径，Gs 和 AC 为其他途径所共有。体外培养时，加入 PGE1 后，cAMP 升高后又下降，细胞发生钝化，同时也对其他 cAMP 途径的信号失去敏感。若将适应后的 Gs 和正常的 Gs 分别转移到 Gs 缺陷的突变细胞株的膜上进行对比观察，发现前者仍然钝化，而后者具有敏感性，因此，提示 Gs 发生了改变。

细胞中有多种受体使用相同的 G 蛋白库，这种钝化会影响所有使用 G 蛋白库的信号转导通路。

5.5.2.3 受体减量调节

除了上述受体的快速钝化之外，当信号分子同细胞表面受体结合后还会发生一种慢速钝化，称为受体减量调节（receptor down-regulation），结果导致存在于质膜上的受体减少。在

此过程中，细胞表面已经同信号分子结合了的受体会通过内吞等作用逐渐减少（图 5-73）。

内吞是使细胞质膜上受体减少的有效方法，细胞也因此降低了对信号分子的敏感性。实际上，许多受体被内吞后，并不被溶酶体消化，它们被逐步释放，慢慢回到细胞膜上，形成受体再循环。在此过程中，始终有一部分受体滞留在细胞质中而不能到膜上发挥作用，这种现象又称为受体隔离。另外，受体内吞也包括结合有配体的受体-配体内吞，一些生长激素就是通过这样的方式被解除信号作用的。

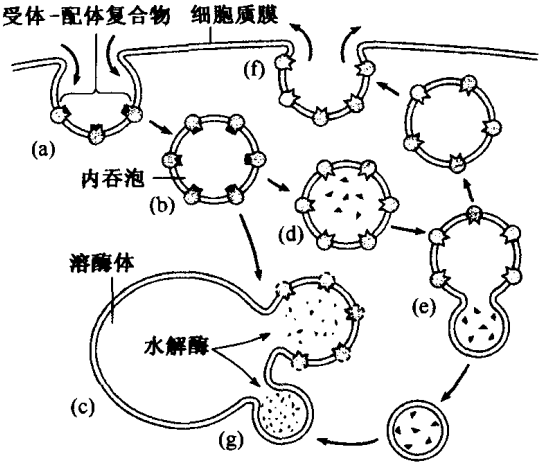


图 5-73　通过受体-配体内吞解除信号作用，详见第 9 章（引自 Wolfe，1993）

5.5.2.4　磷酸酶在细胞信号解除中的作用

另一种信号解除机制是磷酸酶的作用。在许多信号转导途径中，蛋白激酶通过磷酸化作用将一些靶蛋白（酶）激活。蛋白质的磷酸化是一种可逆的化学修饰，所以通过蛋白激酶添加的蛋白质上的磷酸基团可通过蛋白磷酸酶的作用被除去。实验表明，激酶与磷酸酶对底物的影响是相反的，当磷酸化激活底物时，可通过脱磷酸将底物失活，反之亦然。所以，磷酸酶在细胞内的作用与磷酸化酶一样重要。

据估计，人基因组编码 1 000 种以上的磷酸酶（激酶大约 2 000 种），这说明磷酸酶在细胞中是非常重要的酶。如同蛋白激酶一样，某些磷酸酶是多功能的，并且能够脱去几种蛋白质中的磷酸基团。但有些磷酸酶的活性相当专一，只能将一种或两种底物中的磷酸基团脱去。像丝氨酸/苏氨酸和酪氨酸磷酸激酶一样，多数磷酸酶分为丝氨酸/苏氨酸磷酸酶和酪氨酸磷酸酶，它们只能从磷酸化的丝氨酸/苏氨酸残基或磷酸化的酪氨酸残基脱磷酸，但不能同时从这两种类型的残基上脱磷酸。不过，有些磷酸酶既能将磷酸化的丝氨酸/苏氨酸残基上的磷酸脱去，又能从磷酸化的酪氨酸残基脱去磷酸。

提　　要

细胞通讯是指多细胞生物细胞间或细胞内通过高度精确和高度有效的接受信息的通讯机制并通过放大引起快速的细胞生理反应，或者引起基因活动，从而发生一系列的细胞活动来协调各组织行动，使之成为统一的生命整体对外界环境变化做出综合应答。

细胞有 3 种通讯方式：通过信号分子、相邻细胞表面分子的相互作用、细胞与细胞外基质的作用。

信号分子可分为水溶性和脂溶性两种，按信号传导方式可分为3种类型：激素、局部介质、神经递质。

受体分为细胞表面受体和细胞内受体两种。表面受体可分为单次跨膜、7次跨膜和多亚基跨膜3个家族，主要有离子通道偶联受体、G-蛋白偶联受体、酶联受体等3种类型。受体与配体相互作用具有特异性、高亲和力、饱和性、可逆性等特点，并可引发生理反应。研究受体与配体的相互作用常采用单克隆抗体标记法、亲和标记法等。

PKA系统是以cAMP作为第二信使激活蛋白激酶A（PKA）进行信号放大，包括激活型和抑制型两种类型。在激活型中，G蛋白偶联受体与信号分子结合后，G蛋白被激活，活性α亚基与其他两个亚基分离并激活腺苷酸环化酶（AC），产生第二信使cAMP，cAMP激活PKA，PKA再作用于靶蛋白，产生细胞应答。在抑制型中，激活的G蛋白则抑制AC的活性。通过对cAMP的降解可解除PKA系统的信号作用。

PKC系统是以三磷酸肌醇（IP_3）、二酰甘油（DAG）为第二信使，并通过蛋白激酶C（PKC）引起级联反应。PKC系统中，磷脂酶C_β相当于PKA系统的AC，经G蛋白激活后的磷脂酶C_β水解质膜上的4，5-二磷酸磷脂酰肌醇（PIP_2），产生和IP_3和DAG。IP_3的作用是释放出内质网中的Ca^{2+}，DAG和Ca^{2+}共同作用激活PKC，PKC参与多种生化反应的催化。DAG和IP_3的信号解除都可以通过水解和磷酸化来完成，Ca^{2+}的信号解除则需要通过IP_3磷酸化生成的IP_4与质膜、内质网膜上的Ca^{2+}-ATP酶的共同作用。

酶联受体信号转导系统有以cGMP作为第二信使激活蛋白激酶G的系统以及受体酪氨酸激酶/Ras途径。胰岛素受体信号转导途径和表皮生长因子受体信号转导途径是典型的受体酪氨酸激酶途径。Ras蛋白活性受到GAP和GEF的控制，其激活亦涉及Grb2蛋白和Sos蛋白。

整联蛋白介导的黏着斑的装配、黏着斑的信号转导也是细胞表面受体介导的信号转导的重要方式。

细胞信号转导系统具有趋同、趋异与窜扰等现象。信号的终止通过信号分子水解、受体钝化、受体减量调节以及磷酸酶的作用来实现。

6 核糖体与核酶

核糖体（ribosome）是细胞内一种核糖核蛋白颗粒（ribonucleoprotein particle），其惟一功能是按照 mRNA 的指令将氨基酸合成蛋白质多肽链，所以核糖体是细胞内蛋白质合成的分子机器。核糖体最早是 Claude 于 20 世纪 30 年代后期用暗视野显微镜观察细胞的匀浆物时发现的，当时称为微体（microsomes），直到 20 世纪 50 年代中期，Palade 在电子显微镜下观察到这种颗粒的存在。当时 Palade 和他的同事研究了多种生物的细胞，发现细胞质中有类似的颗粒存在，尤其在进行蛋白质合成的细胞中特别多。后来 Siekevitz 用亚细胞组分分离技术分离了这种颗粒，并发现这些颗粒总是伴随内质网微粒体一起沉积。化学分析揭示，这种微粒富含核苷酸，随之命名为 ribosome，主要成分是核糖体 RNA（rRNA），约占 60%，核糖体蛋白质（r 蛋白质）约占 40%。

核糖体的蛋白质合成功能是通过放射性标记实验发现的。将细胞与放射性标记的氨基酸短暂接触后进行匀浆，然后分级分离，发现在微粒体部分有大量新合成的放射性标记的蛋白质。后将微粒体部分进一步分离，得到核糖体和膜微粒，这一实验结果表明核糖体与蛋白质合成有关。

随着分子生物学的发展，核糖体概念的含义有了进一步的发展。细胞内除了从事蛋白质合成的核糖体外，还有许多其他功能的核糖核蛋白体颗粒，通常是一些小分子的 RNA 同蛋白质组成的颗粒，它们参与 RNA 加工、RNA 编辑、基因表达的调控等。

6.1 核糖体的形态结构

20 世纪 80 年代初对核糖体 RNA 加工的研究导致了核酶的发现，这一重大研究成果获得了 1989 年的诺贝尔化学奖。核酶是具有催化活性的反义 RNA，它的发现，不仅证明了酶并非都是蛋白质，而且具有重要的应用价值，包括基因治疗的应用。由于与核糖体的结构和功能有关的三类 RNA 的加工都与核酶有关，所以将核酶（包括反义 RNA）及有关 RNA 加工的知识与核糖体结合在一起介绍，不仅顺理成章，也加强了细胞生物学与分子生物学的联系，起到开阔学生视野的作用。

6.1.1 核糖体的类型和化学组成

6.1.1.1 核糖体的类型和大小

核糖体不仅独立存在于细胞质中，同时也存在于细胞器中。因此，核糖体有 3 种类型：细胞质核糖体、线粒体核糖体、叶绿体核糖体。由于原核细胞质中核糖体与真核细胞质中核糖体的大小和组成都不相同，从这种意义将核糖体分为真核生物核糖体和原核生物核糖体。

原核细胞的核糖体较小，沉降系数为 70S，分子质量为 2.5×10^3kDa，由 50S 和 30S 两个亚基组成（图 6-1）；而真核细胞的核糖体体积较大，沉降系数是 80S，分子质量为 $3.9\times10^3\sim4.5\times10^3$kDa，由 60S 和 40S 两个亚基组成。

虽然核糖体都是由大小两个不同的亚基组成的，但是这两个亚基并非都是结合在一起的，在不进行蛋白质合成时，它们是分开的，并且各自游离存在于细胞质中，只是在进行蛋白质合成时才结合在一起。

Mg^{2+}的浓度对于大小亚基的聚合和解离有很大的影响，体外实验表明：70S 核糖体在Mg^{2+}的浓度小于 1mmol·L^{-1}的溶液中易解离；当 Mg^{2+}浓度大于 10mmol·L^{-1}，两个核糖体通常形成 100S 的二聚体（图 6-2）。

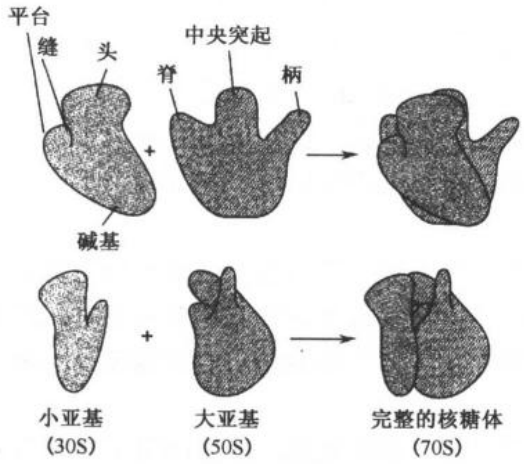


图 6-1　从两个不同角度观察的 *E. coli* 核糖体的三维结构（引自 Kleinsmith *et al.*，1995）

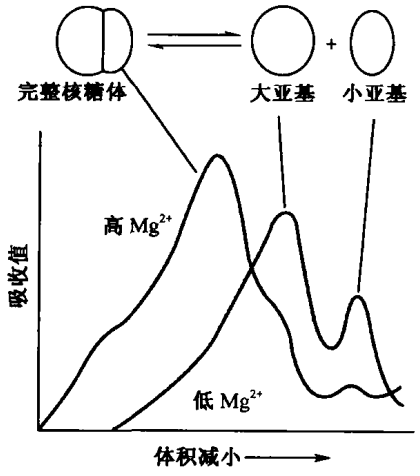


图 6-2　通过区带离心鉴定核糖体的亚基（引自 Kleinsmith *et al.*，1995）
在低浓度的 Mg^{2+}时，完整的核糖体将分成大小两个亚基。

在组成上，叶绿体中的核糖体与原核生物核糖体相同，但线粒体中核糖体的大小变化较大（表 6-1）。

表 6-1　不同类型核糖体的大小比较

来源	完整核糖体	核糖体亚基	核糖体 RNA
细胞质	80S	60S（大亚基）	28S、5.8S、5S
（真核生物）		40S（小亚基）	18S
细胞质	70S	50S（大亚基）	23S、5S
（原核生物）		30S（小亚基）	16S
线粒体	55～60S	45S（大亚基）	16S
（哺乳动物）		35S（小亚基）	12S
线粒体	75S	53S（大亚基）	21S
（酵母）		35S（小亚基）	14S
线粒体	78S	60S（大亚基）	26S、5S
（高等植物）		45S（小亚基）	18S
叶绿体	70S	50S（大亚基）	23S、5S
		30S（小亚基）	16S

在真核细胞中，核糖体进行蛋白质合成时，既可以游离在细胞质中，称为游离核糖体，也可以附着在内质网的表面，称为膜旁核糖体或附着核糖体。真核细胞含有较多的核糖体，每个细胞平均有 $10^6 \sim 10^7$ 个，而原核细胞中核糖体较少，每个细胞平均只有 $15 \times 10^2 \sim 18 \times 10^3$ 个。

6.1.1.2 核糖体的化学组成

核糖体的大小两个亚基都是由核糖体 RNA（rRNA）和核糖体蛋白质（ribosomal protein）组成的，原核生物和真核生物细胞质核糖体的大小亚基在蛋白质和 RNA 的组成上都有较大的差别（图 6-3）

典型的原核生物大肠杆菌核糖体是由 50S 大亚基和 30S 小亚基组成的。在完整的核糖体中，rRNA 约占 2/3，蛋白质约为 1/3。50S 大亚基含有 33 种不同的蛋白质和两种 RNA，大的 rRNA 沉降系数为 23S，小 rRNA 的沉降系数为 5S。30S 小亚基含有 21 种蛋白质和一个 16S 的 rRNA。

真核细胞核糖体的沉降系数为 80S，大亚基为 60S，小亚基为 40S。在大亚基中，有大约 49 种蛋白质，另外有 3 种 rRNA：28S rRNA、5S rRNA 和 5.8S rRNA。小亚基含有大约 33 种蛋白质，一种 18S 的 rRNA。

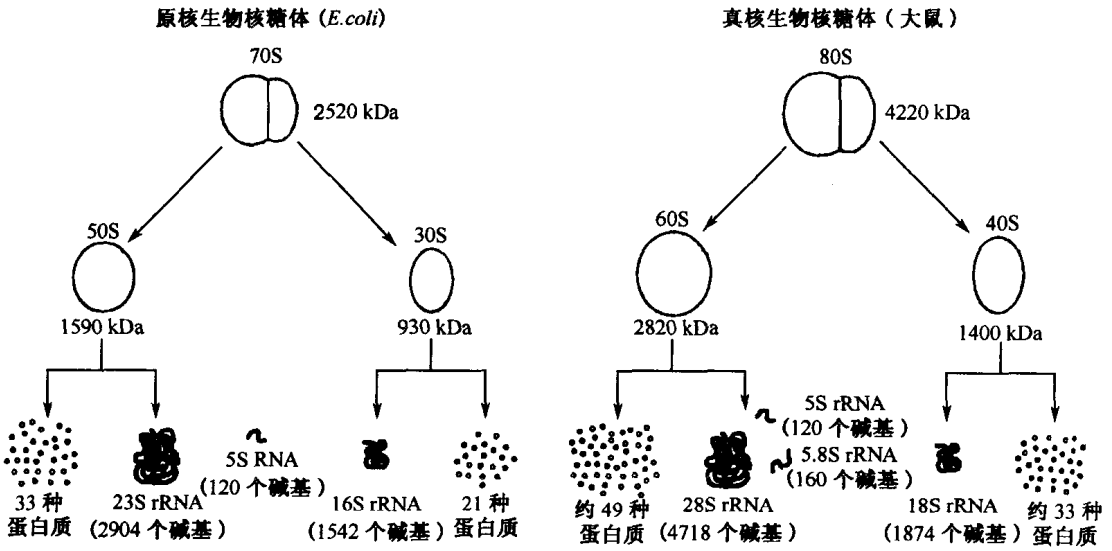


图 6-3 典型的原核和真核细胞质核糖体的化学组成（引自 Kleinsmith *et al.*, 1995）

6.1.2 核糖体蛋白质与 rRNA

由于核糖体有着十分重要的生物学功能，所以有关其结构和各种结构域的功能，一直是研究的重点。为了建立一个完整的核糖体分子结构模型，必须了解构成核糖体的每一种蛋白质和 rRNA 分子在核糖体中的位置。由于核糖体结构的复杂性，使它长期被视为结晶学研究领域中的喜马拉雅山。最近报道的 Moore、Ramakrisshman、Noller 等的研究结果，首次在核糖体及其亚基高度复杂的电子密度图上定位了几种三维结构一致的蛋白质和许多双链 rRNA 区，并揭示了亚基介面的静息结构与 tRNA、mRNA 和核糖体间复杂的相互关系，这一研究

成果被认为是核糖体研究的里程碑。

6.1.2.1 核糖体蛋白

由于组成核糖体的蛋白质种类较多，研究它们各自的特性及在核糖体中的存在方式和作用十分困难，通过电泳和层析等技术，已经鉴定了 *E. coli* 核糖体小亚基的 21 种蛋白质和大亚基的 33 种蛋白质。小亚基的蛋白分别命名为 S1～S21，大亚基的核糖体蛋白命名为 L1～L33。核糖体中的蛋白质除了一种具有 4 个拷贝外，其余都是 1 个拷贝。

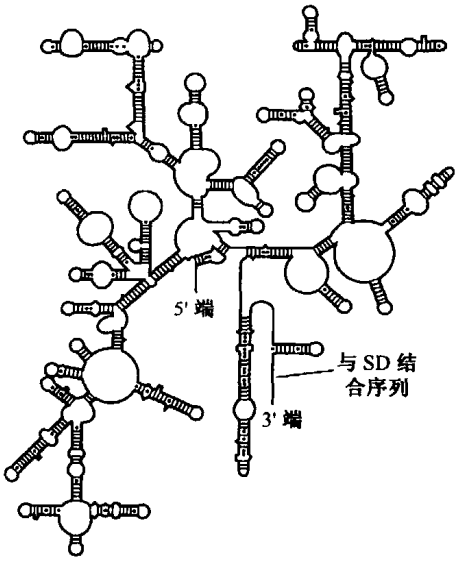


图 6-4 *E. coli* 中 16S rRNA 分子折叠的二级结构（引自 Kleinsmith *et al.*，1995）
折叠主要是由序列中互补碱基配对引起的。

6.1.2.2 核糖体 rRNA

Holler 测定了 *E. coli* 16S rRNA 序列，一共有 1 542 个核苷酸。通过计算机分析，发现不同生物来源的 16S rRNA 的序列组成具有进化上的保守性。推测 16S rRNA 结构有四个结构域，每个结构域都有 46% 的碱基配对，形成螺旋的柄状结构（图 6-4）。每一个柄状结构都很短，不到 8 bp，且并不都是完全配对的。16S rRNA 的电子显微照片的形态与 30S 核糖体亚基相似，因此认为 30S 核糖体亚基的形态主要是由 16S rRNA 决定的。

6.1.3 细菌核糖体的结构模型

为了揭示核糖体的空间结构以及核糖体蛋白质和 rRNA 相互间的关系，分别用物理、化学以及显微技术进行了大量的研究工作，在这些研究工作的基础上提出了细菌核糖体的结构

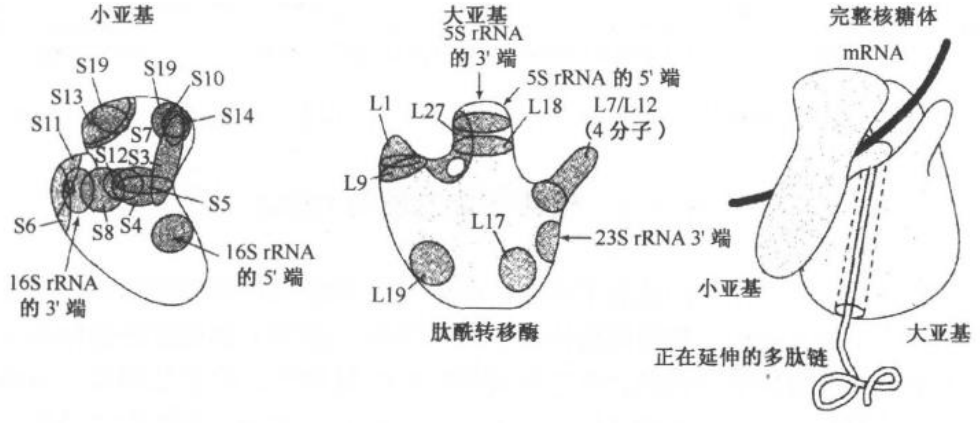


图 6-5 *E. coli* 核糖体结构模型（引自 Kleinsmith *et al.*，1995）
图中分别显示了小亚基、大亚基中一些核糖体蛋白质的位置，以及蛋白质合成过程中 mRNA 在核糖体中的位置。

模型（图 6-5）。模型中蛋白质的定位是根据不同来源的资料分析综合后确定的，如 S4、S5、S8 和 S12 等 4 个蛋白定位在核糖体的小亚基上，并且是背向大亚基，就是根据四种不同方法获得的资料，比较分析后确定的。

在该模型中确定了一些重要的功能区。如在小亚基中确定了与信使 RNA（mRNA）和转移 RNA（tRNA）结合位点，并确定了催化肽键形成的位点位于大亚基。确定了从小亚基中部突出的平台部分含有 16S rRNA 的 3′端，此部位有与 mRNA 结合的序列。与蛋白质合成起始相关的 tRNA、蛋白质因子结合位点定位在与平台相邻的小叶中。大亚基还具有催化肽键形成和 GTP 水解的功能区。

6.2 核糖体的生物发生

提出核糖体的结构模型后，人们自然要问，在生活细胞中核糖体是如何装配的？

核糖体的合成和装配过程相当复杂。在细胞内，核糖体是自我装配的，真核细胞和原核细胞的核糖体合成和装配过程各不相同。核糖体的生物发生（biogenesis）包括蛋白质和 rRNA 的合成、核糖体亚基的组装等。

6.2.1 核糖体 rRNA 基因的转录与加工

核糖体的组成成分是蛋白质和 rRNA，所以编码核糖体的基因分为两类，一类是编码蛋白质的基因，另一类是 rRNA 基因。在生活细胞中，特别是在活跃进行蛋白质合成的细胞中，需要大量的核糖体，这就意味着需要合成大量的 rRNA 和核糖体蛋白质。

6.2.1.1 编码 rRNA 基因的过量扩增

细胞为了满足大量需求的 rRNA，在进化过程中形成了一种机制：增加编码 rRNA 基因的拷贝数。在细胞中扩大 rRNA 基因的拷贝数有两种方式：第一是在染色体上增加 rRNA 基因的拷贝数，如在细菌 *E.coli* 的基因组中有 7 套 rRNA 基因，而典型的真核生物细胞含有几百到几千个 28S、18S 和 5.8S rRNA 基因的拷贝，5S rRNA 基因的拷贝数多达 50 000 个。

在需要大量合成核糖体的细胞中，增加 rRNA 基因拷贝数的第二种机制是通过基因扩增（gene amplification）。科学家用两栖类的卵细胞（卵母细胞）研究发育过程中 rRNA 基因的扩增，发现两栖类卵母细胞在发育的早期，rRNA 基因的数量扩增到 1000 多倍。基因扩增是通过形成几千个核进行的，每个核里含有几百个拷贝的编码 28S、18S 和 5.8S 的 rRNA 基因，最后卵母细胞中的这些 rRNA 基因的拷贝数几乎达到 50 万个，而在相同生物的其他类型细胞中，这些 rRNA 基因的拷贝数

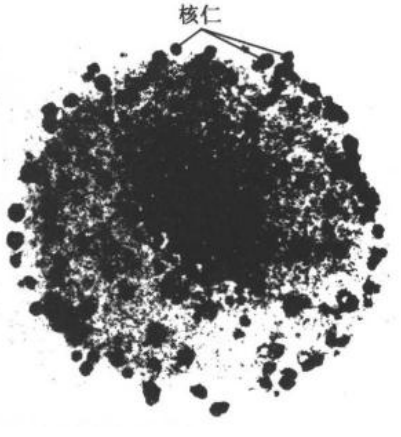


图 6-6 非洲爪蟾卵母细胞中 rRNA 的合成（引自 Karp, 1996）
卵母细胞中含有几百个核仁，每个核仁都含有扩增的 rRNA 基因。

只有几百个。卵母细胞中有如此众多的 rRNA 基因拷贝，为卵细胞在受精后的发育过程中合成大量核糖体创造了条件（图 6-6）。

至于卵母细胞中 rRNA 基因扩增的机制，有人认为可能是通过从染色体上分离出来的环状 DNA 分子，这种环状 DNA 中含有 rRNA 基因，但是第一个含有 rRNA 基因的环状 DNA 是如何形成的尚不清楚。由于环状 DNA 能够通过滚环复制（rolling circle replication）的方式进行复制，因而能够产生大量的 rRNA 基因。

6.2.1.2 真核生物 18S、5.8S、28S rRNA 和 5S rRNA 基因

在真核生物的染色体中，18S、5.8S 和 28S rRNA 基因是串联在一起的，每个基因被间隔区隔开，5S rRNA 基因位于不同染色体上。在人基因组中，18S、5.8S 和 28S rRNA 基因串联在一起，并分布在人的 13、14、15、21 和 22 号染色体上。在间期核中，所有这 5 条染色体 rRNA 基因区域，转录时聚集在一起，形成一个核仁。

真核细胞核糖体的5S rRNA 基因则是独立存在于一个或几个染色体上，拷贝数达几千个。在人的细胞中，该基因的拷贝有24 000个之多，它们串联排列在1号染色体接近末端处。

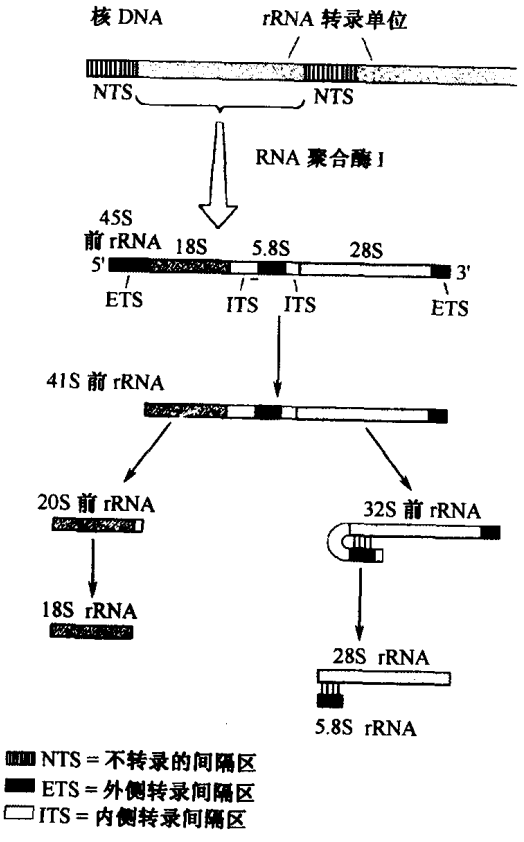


图 6-7 45S 前 rRNA 的加工过程
（引自 Kleinsmith *et al.*, 1995）
在rRNA聚合酶I的作用下，将18SrRNA、5.8SrRNA和28SrRNA转录成45S的前体，然后通过一系列的切割加工形成成熟的18SrRNA、5.8SrRNA和28SrRNA。其中5.8S rRNA通过互补碱基的氢键与28S rRNA结合在一起。

编码 rRNA 基因的 DNA 称为 rDNA。

6.2.1.3 真核生物 18S、5.8S、28S rRNA 基因转录与加工

18S、5.8S 和 28S rRNA 基因首先转录成一个 45S 的前 rRNA（pre-rRNA），大约是这 3 个 rRNA 总长的两倍。能够转录这 3 个前 rRNA 的 DNA 区域称为一个转录单位（transcription unit），意指它们有一个共同的转录起点和转录终点。在转录单位中除了这 3 个 rRNA 基因外，还包括一些间隔区。真核生物中参与 rRNA 基因转录的酶是 RNA 聚合酶 I。前 rRNA 在核仁中被酶剪切成 3 个 rRNA 产物，转录间隔区则被降解掉。

前体的加工过程也十分复杂，通过 ^{3}H 标记的尿嘧啶和放线菌素 D 研究人的培养细胞前 rRNA 合成时发现：当人的细胞同 ^{3}H标记的尿嘧啶共培养 25min 后，被标记 rRNA 的沉降系数是 45S，加入放线菌素 D 阻断 RNA 的合成后，标记的 45S rRNA 首先转变成 32S 的 rRNA，随着培养时间的延长，逐渐出现被标记的 28S、18S 的 rRNA，根据这一研究结果推测前 rRNA 的加工过

程（图 6-7）。

虽然所有真核生物的 18S、5.8S 和 28S rRNA 基因是相同的，并且在染色体上组成同一个转录单位，但是不同生物中的 18S、5.8S 和 28S rRNA 基因的转录起点和间隔区的长短并不完全相同（图 6-8）。

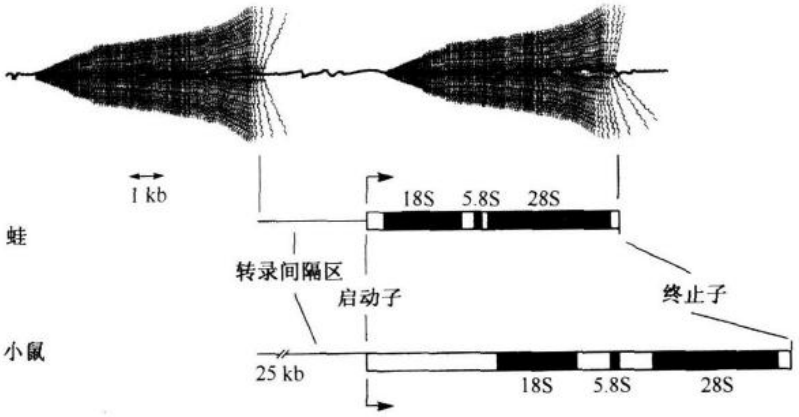


图 6-8　rRNA 转录单位（引自 Karp，1996）

图的上半部是正在转录的 rDNA 形成的刷状 rRNA；下半部是一个转录单位的转录物，并将蛙的 rRNA 转录单位与小鼠的转录单位进行比较。从图中可见：①基因间被可转录的间隔物隔开；②转录单位之间有非转录区；③不同生物的 rDNA 的转录起点可能不同；④不同生物的 rDNA 各基因间的间隔序列长短不同。

由于不同生物的 rDNA 转录起点不同、间隔区长短不同，所以前 rRNA 的大小不都是 45S，范围在 34～45S 之间（表 6-2）。

表 6-2　不同种生物的前 rRNA

生物	前 rRNA 的沉降系数
果蝇	34S
裂殖酵母	37S
烟草	38S
蛙	40S
鸡	45S
小鼠	45S
人	45S

6.2.1.4　真核生物前 rRNA 的修饰

与成熟的 RNA 相比，前 rRNA 有两个独特的特点，一是含有大量的甲基化的核苷，另一个就是具有很多假尿苷（pseudouridine）。在人的核糖体前 RNA 加工过程中，有 100 多个甲基添加到前体分子的核糖上，并且有 95%的尿嘧啶被转变成假尿苷。前 rRNA 分子中的某些碱基进行甲基化修饰，甲基化的主要部位在核糖第二位的羟基上，不过被甲基化的碱基数量不多，在甲基化的过程中需要 snRNA 的参与。甲基化可能对加工起引导作用。实验证明前 rRNA 中被甲基化的部位在加工过程中并未被切除，而是一直保持到成熟的 rRNA 中。另外还发现，如果人为地阻断前 rRNA 的甲基化，前 rRNA 的成熟加工也被阻断，因此，推测前 rRNA 的甲基化对 rRNA 的加工具有指导作用。另外，前 RNA 的修饰可能有利于 rRNA 的正确折叠以及与别的分子正确的相互作用。

6.2.1.5　5S rRNA 基因的转录与加工

5S rRNA 是核糖体大亚基的一个组分，原核生物和真核生物都有 5S rRNA，而且结构相

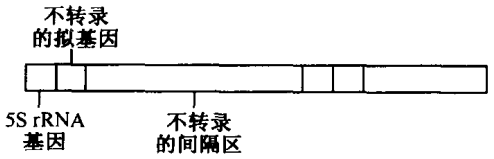
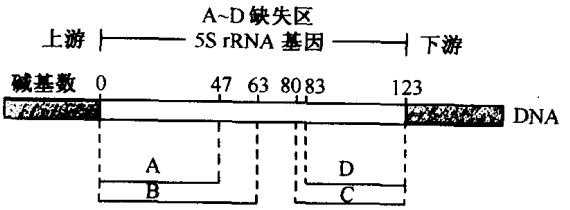


图 6-9　非洲爪蟾的 5S rRNA 基因的组织结构

似。真核生物的 5S rRNA 基因与其他 3 种 rRNA 基因不在同一条染色体上，它是由核仁以外的染色体基因转录的，然后运输到核仁内参与核糖体的装配。5S rRNA 基因的数量比 45S rRNA 转录单位多，人的 5S rRNA 基因有 500 个拷贝，并且在染色体上串连排列。非洲爪蟾的 5S rRNA 基因的排列研究得较为清楚，一个重复单位含有一个 5S rRNA 基因、一个不转录的拟基因（pseudogene）（101bp 的 5S rRNA 基因的片段），每个重复单位间被不转录的间隔序列隔开，间隔序列的长度变化不定，最长达 400bp（图 6-9）；基因转录的速度很快，其结果产生过量的 5S rRNA，有些最后要被降解掉。

5S rRNA 基因是由 RNA 聚合酶 III 转录的，原初转录物的 5′端与成熟的 5S rRNA 的 5′端完全相同。在某些生物中，3′端通常含有多余的核苷酸，在加工时要被切除。所以，5S rRNA 只需要进行简单的加工，或者根本不需要进行加工。

在 3 种 RNA 聚合酶中，RNA 聚合酶 III 通常是与位于转录部分内的启动子结合，而不是与转录起始位点上游的启动子结合；也就是说 RNA 聚合酶 III 使用的是内部启动子，其他的两种酶使用的是上游启动子，实验也证明这种内部启动子的存在。有人将 5S rRNA 基因的 5′侧的上游序列完全除去，并不影响 5S rRNA 基因的转录。但是，如果将 5S rRNA 基因内部缺失一部分序列（从 50 位到 80 位缺失），RNA 聚合酶 III 不仅不能转录这段 DNA，甚至不能结合上去（图 6-10）。如果将 5S rRNA 基因的内部启动子序列插入到基因组的其他部位，会使插入的部位形成一个新的转录起点。



缺失片段	能否被转录
A	能
B	不能
C	不能
D	能

图 6-10　RNA 聚合酶 III 转录 5S rRNA 基因启动子的鉴定（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

将图中 5S rRNA 基因的 A 片段或 D 片段缺失都不影响 RNA 聚合酶 III 的转录，但是将 B 片段或 C 片段缺失，都会影响 RNA 聚合酶 III 的转录。表明 5S rRNA 基因的启动子位于 5S 基因内部的控制区。

有 3 个转录因子参与 RNA 聚合酶 III 对 5S rRNA 基因的转录，其中转录因子 TFIIIA 是 5S rRNA 基因转录特异的，其他两种转录因子是 RNA 聚合酶 III 转录其他基因时都需要的。

6.2.1.6　原核生物 rRNA 基因及转录

虽然原核生物没有细胞核和核仁，但细菌核糖体的组织和结构与真核生物有许多相似之处。原核生物 rRNA 基因也是多拷贝的，并且也要被转录成一个前体，然后再经加工成成熟的 rRNA。但是，原核生物和真核生物的 rRNA 基因在组织结构上有一些重要的差异。首先表现在基因的重复次数上，真核生物的 rRNA 基因重复的次数相当高，而原核生物的 rRNA 基因的重复次数却很少，例如 *E.coli*，只重复了 7 次。另一个差别是，在真核生物中编码 5S

rRNA 的基因位于不同的染色体上，而细菌的 5S rRNA 基因与另外两种 rRNA 基因组成一个转录单位，它们在染色体上的排列顺序是：16S-23S-5S。

通过核酸酶 III（RNaseIII）突变体的研究证明原核生物的 3 种 rRNA 位于同一个原初转录物中。在这种突变体中，3 种 rRNA 位于同一条 rRNA 分子中，但是在正常的细胞中这 3 种 rRNA 是以 3 种独立的小分子存在，这一研究结果也说明 RNaseIII 是将 16S-23S-5S 前 rRNA 切割成单体的主要核酸酶。

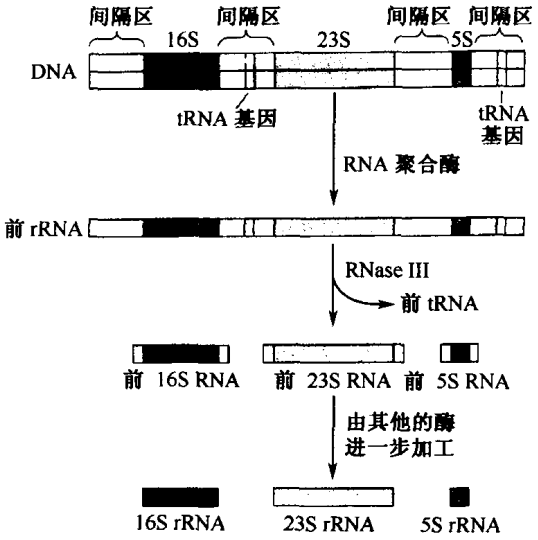


图 6-11　*E. coli* 前 rRNA 的转录与加工
（引自 Kleinsmith *et al.*，1995）

在细菌中 RNaseIII 不是参与前 rRNA 加工的惟一的一种酶，还需要其他一些核酸酶参与，实验证明：如果缺少其他一些酶，就不能得到正确大小的 rRNA。细菌中的 rRNA 转录单位除了转录 3 种 rRNA 外，同时也会产生几种 tRNA 分子。在 16S 和 23S rRNA 间可产生 2 个 tRNA，在 5S rRNA 基因的下游也会产生 1 个 tRNA。

同真核生物一样，细菌的 rRNA 也有甲基化，但比真核生物 rRNA 甲基化程度低。细菌的 rRNA 加工过程示于图 6-11。

6.2.2　核糖体的装配

核糖体是自我装配的细胞器，当蛋白质和 rRNA 合成加工成熟之后就要开始装配核糖体的大小两个亚基，真核生物核糖体亚基的装配地点在细胞核的核仁部位，原核生物核糖体亚基的装配则在细胞质中。

6.2.2.1　核糖体亚基的自我装配

关于原核生物核糖体装配的了解主要是通过体外实验获得的。

为了研究核糖体中蛋白质和 rRNA 的关系及装配机制，1968 年，Nomura 把拆开的大肠杆菌核糖体的 30S 小亚基的 21 种蛋白质与 16S rRNA 在体外混合后重新装配成 30S 小亚基，然后把重建的小亚基同 50S 大亚基以及其他辅助因子混合后，进行蛋白质合成实验，发现重建的核糖体具有生物活性，能催化氨基酸掺入到蛋白质多肽链中。这一实验表明，核糖体是一种自组装（self-assembly）的结构，即没有样板或亲体结构所组成的结构。但是在组装过程中，某些蛋白质必须首先结合到rRNA上，其他蛋白才能组装上去，即组装过程有先后顺序。

Nomura 在实验中采用不同的组合研究了蛋白质与 16S rRNA 的关系，并提出了小亚基的装配图（图 6-12）。该图表明：小亚基在装配的起始，一些蛋白能独立地与 16S rRNA 结合，

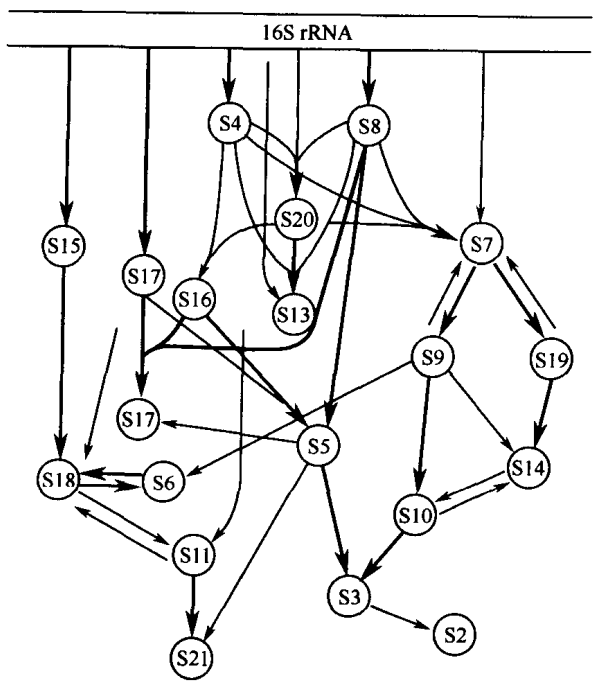


图 6-12 *E.coli* 小亚基的装配图

（引自 Voet *et al.*, 1995）

粗箭头表示结合力强，细箭头表示力弱。如S4与16SrRNA之间是粗箭头，表示S4可直接与16SrRNA结合而不需要其他蛋白的存在。而S7与16SrRNA的结合力很弱，并且需要S4、S8、S9、S19、S20蛋白的存在。

装配的中间物为其他蛋白的结合提供了架构。另外在装配过程中，中间体必须经过构型的变化才能与其他蛋白结合。

在核糖体重装配过程中，可以通过减去某一种蛋白质来验证该蛋白质在亚基装配及亚基中的作用。据此，可将 30S 亚基上的蛋白质分为 3 类：①开始装配所必需的蛋白质，它们先和 rRNA 特定区段结合，形成核糖体亚基的核心；②结合后可为后一批蛋白提供结合位点；③非 30S 亚基形成所必需，但却是显示其活性所必需的。

6.2.2.2 原核生物核糖体重组实验

所谓核糖体重组（ribosome recombination）是指将不同来源的核糖体大小亚基、或不同亚基的 rRNA 或蛋白质重新组合，形成杂合的核糖体后研究其功能的实验方法。结果表明：①30S 亚基的蛋白质专同 16S rRNA 结合；50S 亚基的蛋白质只同 23S rRNA 结合，如果把 30S 亚基 rRNA 和 50S 亚基的蛋白质相混合，则不能装配成有功能的亚基。②从不同种细菌提取 30S 亚基的 rRNA 和蛋白质，可装配成有功能的 30S 亚基，这表明不存在种间差异。③原核生物核糖体与真核生物核糖体的亚基不同，由二者的 rRNA 和蛋白质重组后的核糖体没有功能。④大肠杆菌的核糖体与玉米叶绿体核糖体亚基重组后具有功能。⑤由于不同生物的线粒体核糖体大小不同，由 55S 到 80S 不等，而原核生物的核糖体基本稳定，所以线粒体的核糖体亚基同原核生物核糖体亚基相互重组形成的杂合核糖体没有功能。

6.2.2.3 真核生物核糖体在核仁中装配

真核生物核糖体的合成与装配比原核生物核糖体合成要复杂得多。编码核糖体亚基的蛋白质基因转录后在细胞核中加工成熟，随即运送到细胞质中合成蛋白质，再将合成的蛋白质送回到细胞核的核仁中参与核糖体亚基的装配。组成核糖体亚基的 18S rRNA、5.8S rRNA 和 28S rRNA 基因则是在核仁中边转录边参与核糖体亚基的装配，5S rRNA 却是在细胞核中转录后运送到核仁中参与核糖体亚基的装配。图 6-13 是关于人细胞中核糖体装配的示意图。

按照这个模型，首先要合成与核糖体装配有关的蛋白质，这些蛋白质包括核糖体结构蛋白和与前 rRNA 加工有关的酶。它们都是在细胞质的游离核糖体上合成，然后迅速集中到细胞核并在核仁区参与核糖体亚基的装配。

装配过程中，45S RNA、5S RNA 同蛋白质形成 80S RNA 颗粒，然后 80S 颗粒被降解成

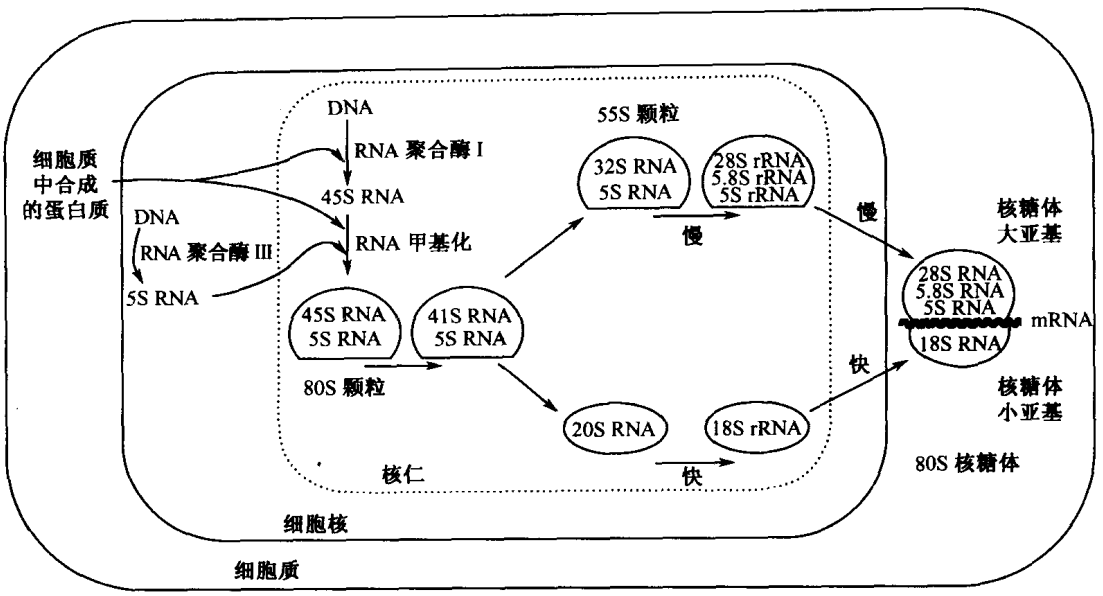


图 6-13　人细胞中核糖体装配的主要过程（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

根据这种装配模型，从核 DNA 转录的 45S 前 rRNA 与蛋白质结合、甲基化、与 5S rRNA 结合形成 80S 核糖核蛋白颗粒。通过 RNA 的加工，将 80S 的颗粒转变成大小核糖体亚基，然后被运送到细胞质参与蛋白质的合成。

大小两个颗粒，大颗粒为 55S，含有 32S 和 5S 两种 RNA，小颗粒含有 20S 的前 rRNA。然后，小颗粒中的 20S 前 rRNA 被快速降解成 18S 的 rRNA，并运送到细胞质中，即是成熟的核糖体小亚基。55S 大颗粒中的 32S RNA 被加工形成 28S 和 5.8S 两种 rRNA 并与 5S rRNA 装配成成熟的大亚基后，被运送到细胞质中，这个过程比较慢。如果这时有 mRNA 同小亚基结合的话，大亚基即可结合上去形成完整的核糖体，并进行蛋白质的合成。

最早发现核仁与核糖体形成有关的是 20 世纪 60 年代初期 Perry 的研究工作。他用紫外微光束破坏活细胞的核仁，发现破坏了核仁的细胞丧失合成 rRNA 的能力，这一发现提示核仁与核糖体的形成有关。后来 Perry 又发现低浓度的放线菌素 D 能够抑制 $^{3}H^{-}$ 尿嘧啶掺入 rRNA 中，而不影响其他种类的 RNA 合成。显微放射自显影也显示放线菌素 D 能够选择性阻止核仁 RNA 的合成，表明核仁与 rRNA 的合成有关。

6.3　核糖体的功能——蛋白质的合成

核糖体的功能是进行蛋白质的合成。在核糖体上合成的只是蛋白质的一级结构，即多肽链。合成是从多肽链的 N 端开始，到 C 端结束。对于 mRNA 来说，合成的方向则是 5′→ 3′端。蛋白质的合成涉及核糖体的一些功能位点和 RNA 的作用。

6.3.1　核糖体的功能位点

原核生物核糖体中有 4 种与 RNA 分子结合的位点，其中一个是与 mRNA 结合的位点，

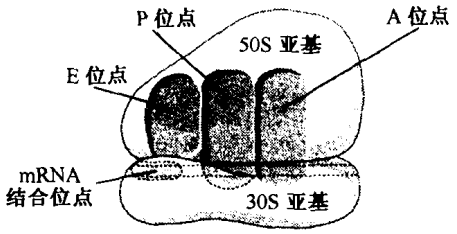


图 6-14　原核生物核糖体中与 RNA 结合的位点（引自 Becker *et al*., 1996）

另 3 个是与 tRNA 结合的位点（图 6-14）。

A 位点（A site），即氨酰基位点，是与新掺入的氨酰 tRNA（aminoacyl-tRNA）结合的位点，又叫受位（entry site），主要位于大亚基，是接受氨酰 tRNA 的部位。

P 位点（P site），即肽酰 tRNA 位点（peptidyl-tRNA site），又叫供位（donor site），或肽酰基位点，主要位于大亚基，是肽基tRNA移交肽链后肽酰tRNA所占据的位置，即与延伸中的肽酰 tRNA 结合位点。

E 位点（exit site）是脱氨酰 tRNA（deaminoacyl-tRNA）离开 A 位点到完全从核糖体释放出来的一个中间停靠点，只是作暂时的停留。当 E 位点被占据之后，A 位点同氨酰 tRNA 的亲和力降低，防止了氨酰 tRNA 的结合，直到核糖体准备就绪，E 位点腾空，才会接受下一个氨酰 tRNA。

mRNA 结合位点。蛋白质的起始合成，首先需要 mRNA 同小亚基的结合，推测在核糖体上必然有与 mRNA 结合的位点。原核生物与真核生物的 mRNA 的 5′端结构不同，真核生物 mRNA 的 5′端有帽子结构，原核生物则没有，推测它们同核糖体的结合机制是不同的。

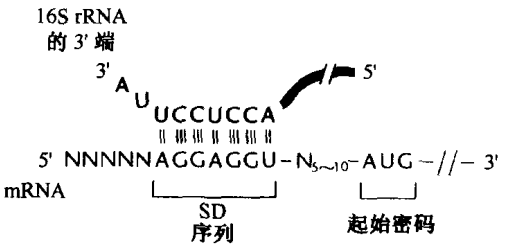


图 6-15　典型的细菌核糖体与 mRNA 的结合位点
mRNA 中的 SD 序列与核糖体16S rRNA 3′端互补。在 SD 序列的下游5～10个碱基处是起始密码 AUG 或 GUG。

在原核生物中，核糖体中与 mRNA 结合位点位于 16S rRNA 的 3′端，mRNA 中与核糖体 16S rRNA 结合的序列称为 SD 序列，它是 1974 年由 Shine 和 Dalgarno 发现的，故此而命名。SD 序列是 mRNA 中 5′端富含嘌呤的短核苷酸序列，一般位于 mRNA 的起始密码 AUG 的上游5～10个碱基处，并且同 16S rRNA 3′端的序列互补（图 6-15）。真核生物没有 SD 序列，mRNA同核糖体小亚基的结合主要是依赖于 mRNA 5′端甲基化帽子结构的识别。

6.3.2　蛋白质合成的基本过程

蛋白质合成，或称 mRNA 翻译是细胞中最复杂的合成活动。蛋白质的合成需要携带氨基酸的各种 tRNA、核糖体、mRNA、不同功能的蛋白质因子、阳离子、GTP 等的参与。蛋白质合成过程之所以复杂，是因为构成蛋白质的 20 种氨基酸要按照密码精确地掺入到多肽中，不能有丝毫的差错。

在核糖体上合成多肽链，分为 3 个完全不同的过程：链的起始、链的延伸、链的终止。

6.3.2.1 蛋白质合成的起始

蛋白质合成起始（initiation）涉及mRNA、起始tRNA和核糖体小亚基之间的相互作用，最后装配成完整的核糖体，起始过程分3步完成（图6-16）。

（1）30S亚基与mRNA的结合　mRNA不能与完整的核糖体结合，但是能够同独立存在的30S核糖体小亚基结合。在原核生物中，30S核糖体小亚基通过16S rRNA与mRNA起始密码子AUG上游的SD序列的互补，从而与mRNA结合。

在真核生物中，小亚基首先识别mRNA 5′端甲基化的帽子结构，然后沿着mRNA滑动，直到特别的识别序列（典型的识别序列是：5′-CCACCAUGC-3′），在识别序列中含有起始密码子AUG。大约有90%的真核生物mRNA的起始密码子是AUG。

核糖体小亚基与mRNA的结合还需要起始因子（initiation factor，IF）的帮助，原核生物的起始因子命名为IF，真核生物的起始因子命名为eIF。原核生物有3种起始因子，其中有两种（IF1、IF3）通过与30S核糖体亚基的结合帮助30S亚基与mRNA的识别与结合。真核生物至少有10个起始因子，其中eIF4被认为是同mRNA 5′端的帽子结构结合，从而介导mRNA与核糖体小亚基的附着。

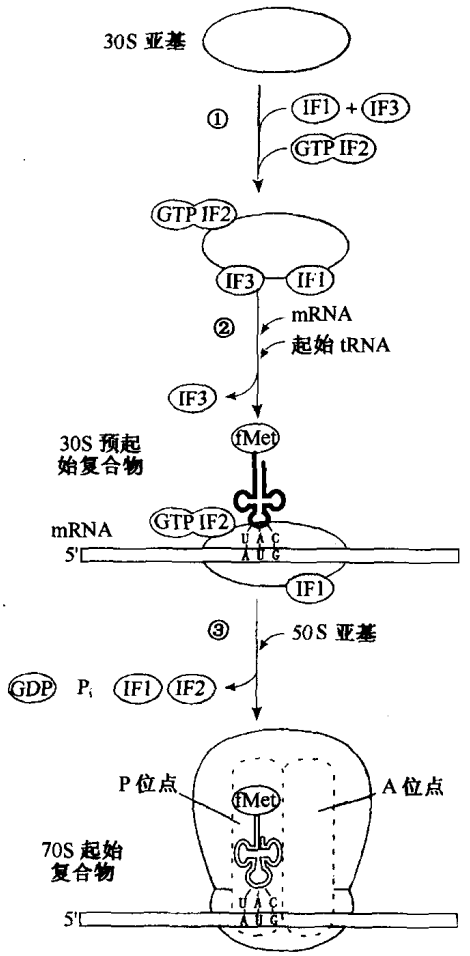


图6-16　原核生物蛋白质合成的起始
（引自 Kleinsmith *et al.*，1995）
起始过程涉及多步反应，在原核生物中需要三个起始因子，在真核生物中涉及多个起始因子。

（2）第一个氨酰-tRNA进入核糖体　当mRNA与核糖体小亚基结合后，携带甲酰甲硫氨酸的tRNA通过反密码子与mRNA中AUG的识别从而进入核糖体。起始tRNA在与mRNA形成mRNA-30S亚基复合物之前，必须同GTP、起始因子IF2结合，形成GTP-IF2-$tRNA^{fMet}$复合物。起始tRNA复合物与mRNA的AUG密码子结合后，释放IF3。

（3）完整起始复合物的装配　一旦起始tRNA与AUG密码子结合，核糖体大亚基就加入到复合物中形成完整的核糖体-mRNA起始复合物。该过程伴随GTP的水解、IF1和IF2的释放。其中GTP的水解可能引起核糖体构型的变化，而改变了的构型正是蛋白质合成所必需的。

6.3.2.2 多肽链的延伸

一旦起始复合物形成，蛋白质的合成随即开始，此过程称为蛋白质合成的延伸（elongation）。延伸涉及4个重复的步骤：①氨酰tRNA进入核糖体的A位点；②肽键形成；③转位；④脱氨酰tRNA释放。上述4步的循环，使肽链不断延长。在整个过程中，需要GTP和一些延长因子的参与（图6-17）。

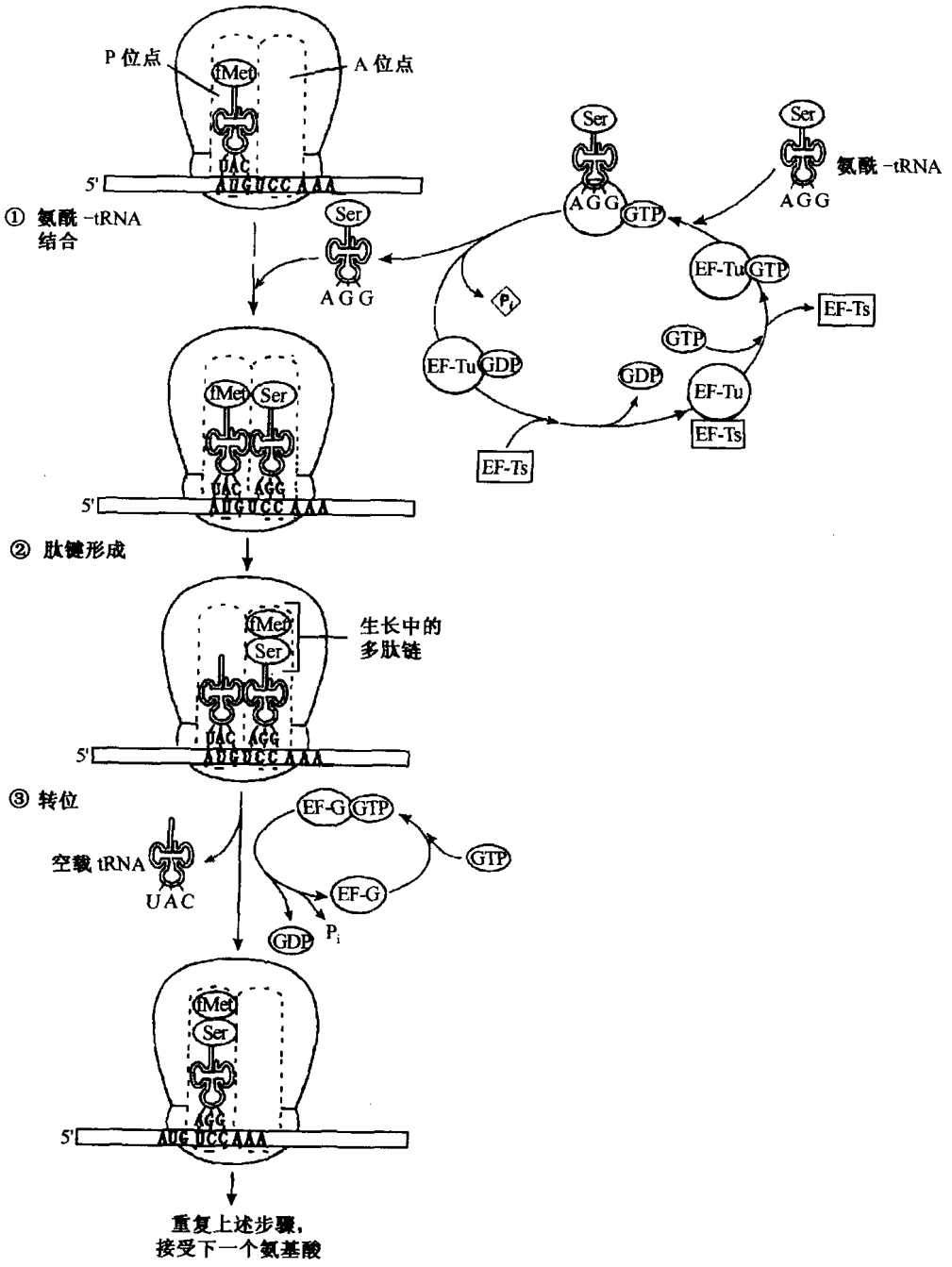


图6-17 蛋白质合成的延伸（引自 Kleinsmith *et al.*, 1995）

（1）氨酰-tRNA进入A位　由于起始tRNA占据P位点，核糖体开始接受第二个氨酰-tRNA进入A位点，此即为延伸的第一步。第二个氨酰-tRNA在进入A位点之前，必须与结合有GTP的蛋白延伸因子结合（原核细胞中延伸因子是Tu，真核生物则是eEF1）。Tu起传递作用，即将氨酰-tRNA传递给核糖体。虽然任何氨酰-tRNA-Tu-GTP都有可能进入A位点，但只有反密码子与A位点密码子相匹配的tRNA才允许进入A位点。一旦合适的氨酰-tRNA-Tu-GTP同A位点的密码子结合，GTP水解，Tu-GDP被释放。

（2）肽键形成　当核糖体的P位点和A位点都有tRNA占据时，进入核糖体的两个氨基酸是分开的，延伸反应的第二步是两个氨基酸相互作用，通过肽键的形成将两个氨基酸结合起来。即由A位点的氨酰-tRNA上氨基酸的氨基与P位点氨酰-tRNA上氨基酸的羧基间形成肽键，使P位点的tRNA卸去氨基酸，而A位点上的tRNA形成了二肽。肽键的形成是自动发生的，不需要额外的能量；这一反应是由肽酰转移酶（peptidyl transferase）催化的，该酶是核糖体大亚基的组成成分。多年来一直认为肽酰转移酶是组成50S亚基的一种蛋白，现在已经清楚，它是构成核糖体的RNA，是核酶。

（3）转位（translocation）　当形成了第一个肽键时，A位点上的tRNA分子的一端仍然与mRNA的密码子结合，而另一端与肽结合．此时P位点上的tRNA没有氨基酸的结合。接下来进入延伸反应的第三步：转位，即核糖体沿着mRNA从5′→3′方向移动三个核苷酸（一个密码子），在此过程中，A位点的tRNA-二肽移到P位点，而P位点的tRNA则进入E位点。转位需要另一个GTP结合的延伸因子的参与（原核生物是延伸因子G，真核生物是延伸因子eEF2）。GTP水解释放的能量转变成机械能，将核糖体沿着mRNA移动大约1nm。

通过足迹法（footprinting）分析，揭示在蛋白质合成的延伸循环中，tRNA的转位是分两

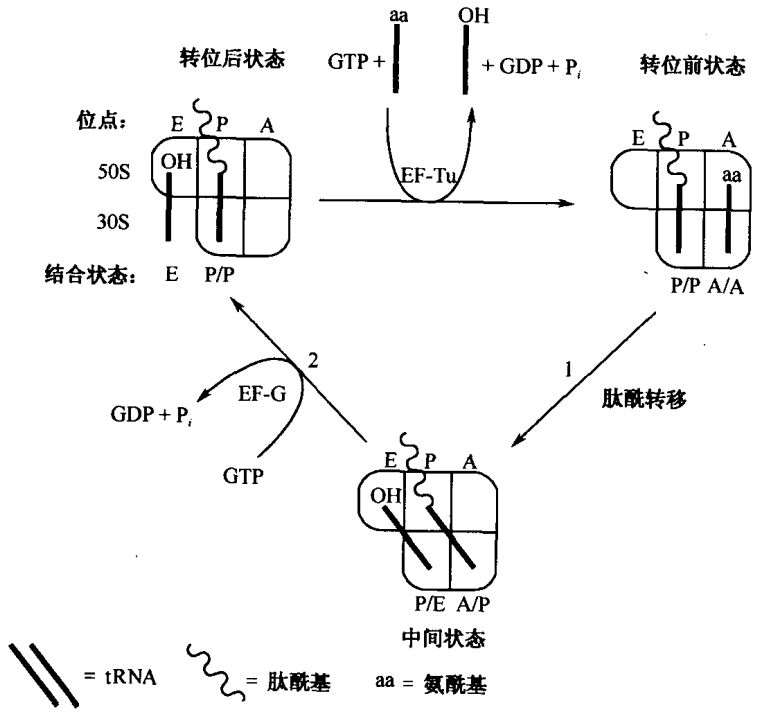


图6-18　核糖体在蛋白质合成延伸循环的转位中的结合状态（引自 Voet *et al.*, 1995）

步进行的，并且相互独立（图 6-18）。

第一步，肽键的形成引起新形成的肽酰 tRNA 大亚基的受体末端部分从 A 位点向 P 位点偏移，而它的小亚基的反密码子部分仍然与 A 位点的密码子相连（此时的状态称为 A/P 结合状态）。新形成脱氨酰 tRNA 的受体末端从大亚基的 P 位点向 E 位点偏移，而它的反密码子部分仍然在小亚基的 P 位点，此时的状态称为 P/E 结合状态。

第二步，核糖体与 EF-G·GTP 复合物结合，引起这些 tRNA 的反密码子的末端与它们结合的 mRNA 一起相对于小亚基移动，使得肽酰- tRNA 完全占据大、小亚基的 P 位点（P/P 结合状态），而脱氨酰 tRNA 则完全移到大亚基的 E 位点。

（4）脱氨酰 tRNA 的释放　　延伸反应的最后一步是脱氨酰 tRNA 离开核糖体 E 位点。一旦肽酰 tRNA 转位到 P 位点，A 位点再次开放，接受下一个氨酰 tRNA。在这种情况下，进入的氨酰 tRNA 的反密码子必须与第三个密码子互补，以此开始下一个循环。

在蛋白质合成的延伸反应中，每一次循环至少水解两分子的 GTP，耗时 0.05s，速度之快是惊人的。

6.3.2.3　终止

蛋白质合成的终止（termination）是指核糖体沿着 mRNA 移动，如果进入 A 位点的是终止密码子，由于没有与之匹配的反密码子，而终止蛋白质的合成。一共有 3 种终止密码子：UAA、UAG、UGA，其中任何一种进入 A 位点都会终止蛋白质的合成，并导致多肽链从核糖体释放出来（图 6-19）。

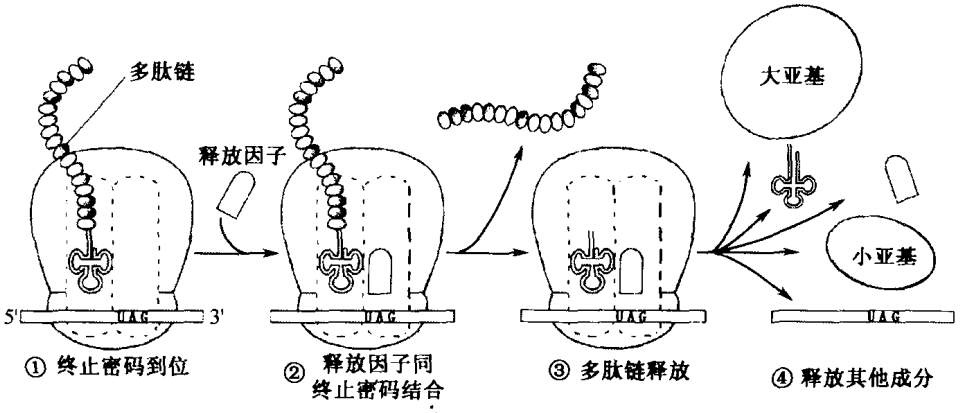


图 6-19　蛋白质合成的终止（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

原核细胞使用几种不同的释放因子与终止密码子作用，而真核细胞中所有的终止密码子都是与相同的释放因子作用。

蛋白质合成的终止需要释放因子（release factor，RF）的存在。细菌有 3 种终止释放因子：RF1，它能够识别 UAA 和 UAG 终止密码子；RF2，识别终止密码子 UAA 和 UGA；RF3，并不识别特异的终止密码子，但是能够增加其他因子的活性。真核细胞有两种释放因子：eRF1 和 eRF3，这两种因子共同作用，能够识别所有的终止密码子。后来的研究表明，释放因子与 tRNA 非常相似，所以释放因子能够进入 A 位点直接与终止密码子相互作用。

6.3.3 多聚核糖体

在蛋白质合成过程中，同一条 mRNA 分子能够同多个核糖体结合，同时合成若干条蛋白质多肽链，结合在同一条 mRNA 上的核糖体就称为多聚核糖体（polysome 或 polyribosome）（图 6-20）。

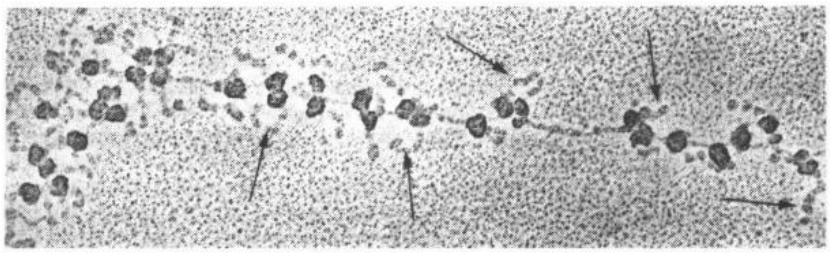


图 6-20　电子显微镜观察的多聚核糖体（引自 Voet *et al*.，1995）
图中所示是蚕的丝心蛋白 mRNA 3′端多聚核糖体，箭头所示是丝心蛋白多肽。

20 世纪 60 年代有几个实验室先后发现了多聚核糖体。如 Rich 的实验室采用未成熟的红细胞研究蛋白质合成时发现了多聚核糖体。他们将未成熟的红细胞与放射性物质进行短暂培养，以标记新合成的蛋白质。然后温和地破碎细胞，离心除去细胞核和线粒体，收集上清液，在上清液中含有核糖体。然后通过移动区带离心，发现除了 80S 的核糖体之外，还有 170S 的核糖体，而放射性的标记物主要存在于 170S 的核糖体上，因此推断在蛋白质合成时，核糖体可能是成串存在的。电子显微镜观察证实：80S 的核糖体是单个存在的，而 170S 的核糖体是由 4～6 个核糖体组成的多聚核糖体。

多聚核糖体的形成　在 mRNA 的起始密码子部位，核糖体亚基装配成完整的起始复合物，然后向 mRNA 的 3′端移动，直到到达终止密码子处。当第一个核糖体离开起始密码子后，空出的起始密码子的位置足够与另一个核糖体结合时，第二个核糖体的小亚基就会结合上来，并装配成完整的起始复合物，开始蛋白质的合成。同样，第三个核糖体、第四个核糖

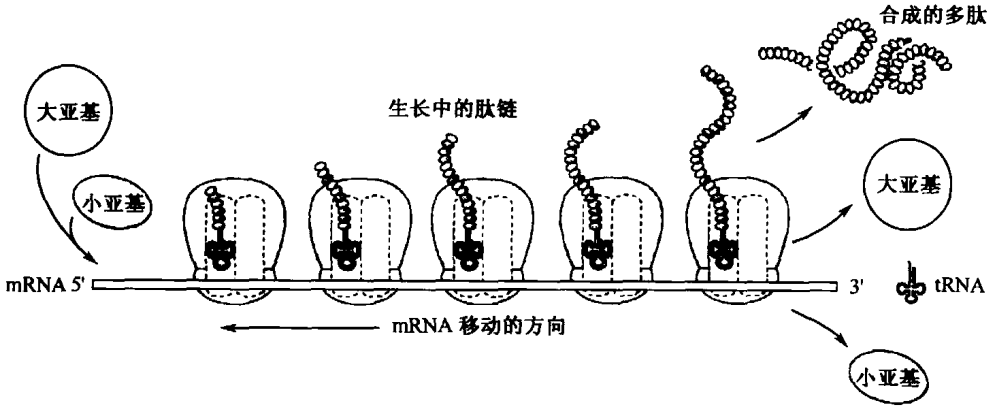


图 6-21　多聚核糖体的形成与蛋白质合成（引自 Kleinsmith *et al*.，1995）

体……依次结合到 mRNA 上（图 6-21）。根据电子显微照片推算，多聚核糖体中，每个核糖体间相隔约 80 个核苷酸。同一条 mRNA 被多个核糖体同时翻译成蛋白质，大大提高了蛋白质合成的速率，也减轻了细胞核进行基因转录和加工的压力。

6.3.4 蛋白质合成抑制剂

不同的蛋白质合成抑制剂具有不同的作用机制，是研究蛋白质合成机制的有用工具。

6.3.4.1 抗生素

抗生素（antibiotic）是主要的蛋白质合成抑制剂，如氯霉素、链霉素等。

不同的抗生素作用机制不同，如链霉素主要是抑制起始 tRNA 和非起始 tRNA 与核糖体的结合，导致肽链合成的提前终止。此外，链霉素也可引起遗传密码子的错读，例如，将链霉素加入正在用人工合成的 poly U 进行翻译的核糖体中，异亮氨酸、亮氨酸、丝氨酸、酪氨酸和苯丙氨酸都能掺入到新合成的多肽中。正常情况下，polyU 只编码苯丙氨酸。有研究表明在生活细胞中 S12 蛋白具有抗链霉素密码子错读的作用。另外，有些抗生素（如氯霉素）抑制 50S 大亚基肽酰转移酶的活性。

表 6-3 是一些常用抗生素对蛋白质合成的影响。

表 6-3 某些抗生素对蛋白质合成的抑制作用

名称	作用对象	阻断过程	影响效果	作用的细胞类型
氯霉素	50S	延伸	肽键形成	原核生物
大肠杆菌素 E3	30S	起始、延伸	与 mRNA 结合	原核生物
			与氨酰 tRNA 结合	
放线菌酮	60S	起始，延伸	结合起始 tRNA 转位(tRNA 从 P 位点释放)	真核生物
白喉毒素	eEF2	延伸	转位	真核生物
红霉素	50S	起始	起始复合物形成	原核生物
梭链孢酸	EF-G/eEF-2	延伸	转位	原核/真核生物
春日霉素	30S	起始	起始 tRNA 的结合	原核生物
嘌呤霉素	50S/60S	延伸	肽键形成（触发链释放）	原核/真核生物
壮观霉素	30S	延伸	转位	原核生物
链霉素	30S	起始，延伸	起始 tRNA 结合	原核生物
			氨酰 tRNA 结合（诱发错读）	
四环素	30S	延伸，终止	氨酰 tRNA 的结合	原核生物
			RF1 和 RF2 的结合	
紫霉素	50S/30S	阻断 P 位点	转位	原核生物

图 6-22 是一些常见的蛋白质合成抑制剂的结构。

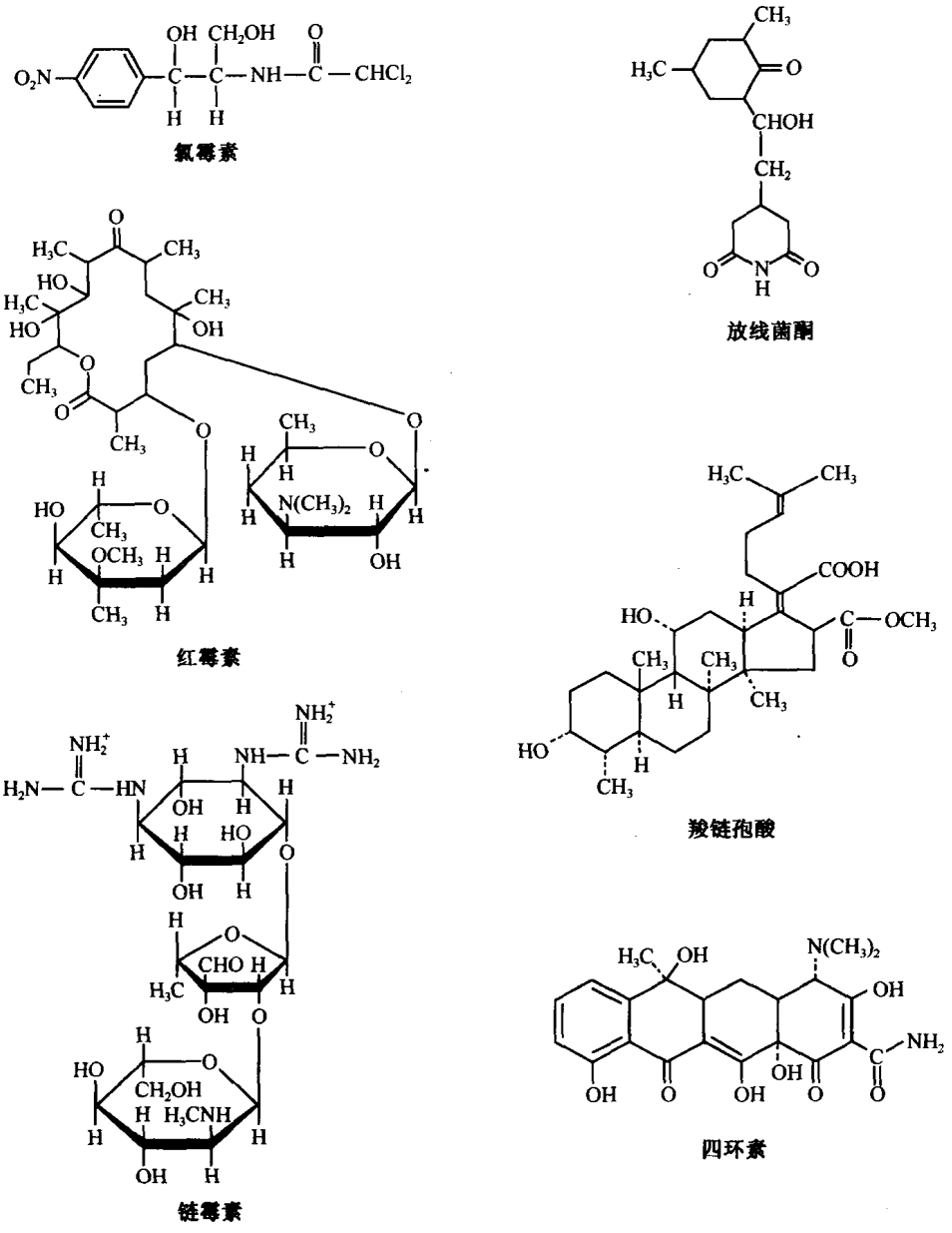


图 6-22　几种常见的抑制蛋白质合成的抗生素

6.3.4.2　嘌呤霉素

嘌呤霉素（puromycin）是一种蛋白质合成抑制剂，它具有与 tRNA 分子末端类似的结构（图 6-23），能够同氨基酸结合，代替氨酰化的 tRNA 同核糖体的 A 位点结合，并掺入到生长的肽链中。虽然嘌呤霉素能够同 A 位点结合，但是不能参与随后的任何反应，因而导致蛋白质合成的终止并释放出 C 端含有嘌呤霉素的不成熟的多肽。

蛋白质合成过程中，核糖体的 A 位点和 P 位点是两个极为重要的功能位点，它们的存在主要是通过嘌呤霉素的抑制实验研究证实的。

通过嘌呤霉素对蛋白质合成的抑制实验发现核糖体的 A 位点和 P 位点是两个独立的位

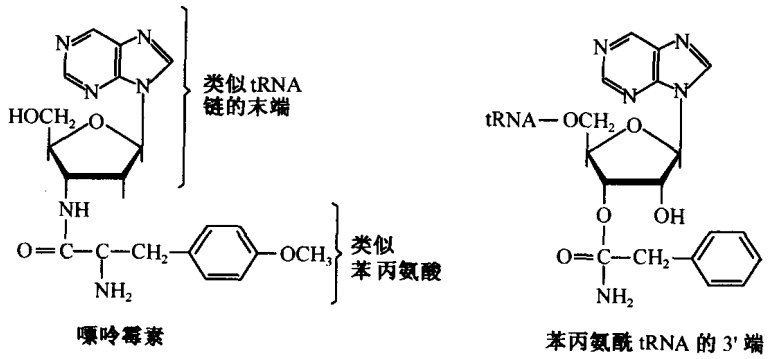


图 6-23　嘌呤霉素与苯丙氨酰 tRNA 3′端结构的比较

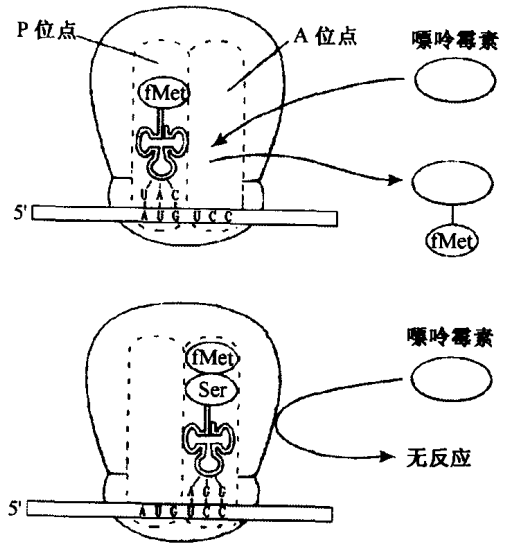


图 6-24　用嘌呤霉素证明核糖体的 A、P 是两个独立存在的位点（引自 Kleinsmith *et al.*, 1995）

点。实验分两组进行，在第一组实验中，将 P 位点结合有起始 tRNA 的核糖体与嘌呤霉素一起温育，在这种条件下，嘌呤霉素与核糖体结合，并且能够同起始 tRNA 相互作用。在第二组实验中，将 P 位点结合有起始 tRNA 的核糖体先与氨酰 tRNA 一起温育，使之形成肽键，然后再加入嘌呤霉素，此时加入的嘌呤霉素既不能同核糖体结合也不能与二肽酰 tRNA 相互作用。但是在反应体系中加入 GTP 和延长因子 G 后，嘌呤霉素则又能与核糖体结合，根据这两组实验结果可以判断核糖体中的 A、P 是两个分开的独立位点（图 6-24）。

可以这样分析：在第一组实验中，只有起始 tRNA 占据 P 位点，如果 A 位点是一个独立位点的话，此时的 A 位点就是空闲的，嘌呤霉素当然能够结合上去，如果 A 位点与 P 位点是同一位点，那么嘌呤霉素就不能与核糖体结合，实验结果是嘌呤霉素能够结合。在第二组实验中，由于 A 位点已经被占据，嘌呤霉素无法与 A 位点结合，只有加入延伸因子和 GTP 后，使 A 位点腾空，嘌呤霉素才能结合到核糖体上。因此，根据这两组实验结果可以断定 A、P 是两个独立的功能位点。

6.3.5　细胞中蛋白质的寿命与降解

蛋白质是细胞功能的体现者，所以蛋白质的合成是细胞中最重要的合成事件。但是，细胞内蛋白质的种类和数量的控制不仅和蛋白质合成的速度有关，而且与蛋白质的寿命相关。

6.3.5.1 蛋白质的寿命信号

细胞内新生的蛋白质通常有3种特别的信号：加工信号、分选定位信号、寿命信号。每一种蛋白质都有寿命特征，称为半寿期（half life）。蛋白质的半寿期通常与蛋白质的功能相关，某些蛋白，如糖酵解的酶、红细胞的珠蛋白等的寿命都很长。而那些启动DNA复制和触发细胞分裂的蛋白质的寿命则很短。控制蛋白质寿命的机制目前尚不十分清楚，但在控制蛋白质轮回的因素中，有一种是多肽链N端特异的氨基酸，它们对蛋白质的寿命有控制作用。如末端是精氨酸或赖氨酸的多肽，寿命就很短，而末端是缬氨酸或甲硫氨酸的多肽，寿命就很长。蛋白质N端与半寿期的关系，称为N端规则（N-end rule）。表6-4总结了酵母中的N端规则。

表6-4 裂殖酵母中蛋白质N端氨基酸对蛋白质半寿期的影响

末端氨基酸残基	半寿期/min	末端氨基端残基	半寿期/ min
Arg	2	Ile	30
Lys	3	Glu	30
Phe	3	Pro	>500
Leu	3	Cys	>1800
Trp	3	Ala	>1800
His	3	Ser	>1800
Asp	3	Thr	>1800
Asn	3	Gly	>1800
Tyr	10	Val	>1800
Gln	10	Met	>1800

6.3.5.2 蛋白酶体对蛋白质的降解

细胞中的许多蛋白质完成功能之后，虽然还有活性，但是对于细胞来说已经不需要了，为了保证细胞正常的生命活动，必须将这些正常的蛋白迅速降解。执行这一任务的是多蛋白的复合体，称为蛋白酶体（proteasome）。蛋白酶体既存在于细胞核中，又存在于胞质溶胶中。蛋白酶体是一种中空的圆桶形的结构，上下是帽子结构，中间的圆桶是由蛋白酶组成的复合体，酶的催化活性部分朝向圆桶的内室，所以蛋白酶对蛋白质的降解是与环境隔离的。蛋白酶体主要降解两种类型的蛋白质：一类是错误折叠的蛋白质，另一类就是需要进行数量调控的蛋白质。

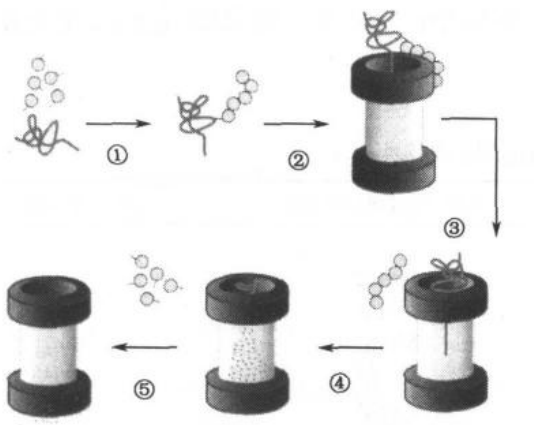


图6-25 蛋白酶体对蛋白质的降解作用
（引自 Karp, 1999）
①被降解的蛋白质与多个遍在蛋白质分子共价结合，从而被标记；②蛋白质-遍在蛋白质共价结合的复合物与蛋白酶体顶部的帽子结合；③遍在蛋白质被切除，未折叠的蛋白质被送入蛋白酶体的腔；④～⑤：蛋白质在蛋白酶体中被降解。

蛋白酶体对蛋白质的降解通过遍在蛋白质介导，所以又称为遍在蛋白质降解途径。遍在蛋白质是由76个氨基酸残基组成的小肽，它的作用主要是识别要被降解的蛋白质，然后将这种蛋白质送入蛋白酶体的圆桶中进行降解。蛋白酶体对蛋白质的降解作用分为两个过程：一是对被降解的蛋白质进行标记，由遍在蛋白质完成；二是蛋白酶解作用，由蛋白酶体催化（图6-25）。

6.4 反义 RNA 与核酶

在研究真核生物核糖体 rRNA 加工时发现了某些 rRNA 具有酶的功能，能够自我剪接，同时还发现一些小分子的反义 RNA 参与核糖体 RNA 的修饰。另外还发现 50S 核糖体中的 23S rRNA 具有肽酰转移酶的功能。这一系列的发现提出了一个新的问题：酶并非都是蛋白质，某些 RNA 也具有酶的功能，这就是核酶（ribozyme）。

6.4.1 小分子 RNA 与反义 RNA

真核生物细胞中，除了 mRNA、rRNA 和 tRNA 外，细胞核和细胞质中含有许多其他类型的小分子 RNA，它们的长度为 100 到 300 个碱基，在酵母中最长的约 1000 个碱基。多的每个细胞中可含有 $10^5 \sim 10^6$ 个 RNA，少的则不可直接检测到，它们由 RNA 聚合酶 II 或 RNA 聚合酶 III 所合成，其中某些像 mRNA 一样可被加帽。

6.4.1.1 小分子 RNA 的类型

主要有两种类型的小分子 RNA：一类是 snRNA（small nuclear RNA），存在于细胞核中；另一类是 scRNA（small cytoplasmic RNA），存在于细胞质中。

小分子的 RNA 和蛋白质组成的小核糖核蛋白颗粒在细胞的生命活动中具有十分重要的作用。某些 snRNP 和剪接作用密切相关，它们分别与供体和受体剪接位点以及分支点序列相互补。细胞质小分子的 RNA 参与蛋白质的合成和运输，如 SRP 颗粒就是一种由一个 7S RNA 和蛋白质组成的核糖核蛋白体颗粒，主要作用是识别信号肽，将核糖体引导到内质网。

由于 snRNA 富含尿嘧啶核苷，分类时把它分为 U1、U2 等，常见的 snRNA 的类型和功能列于表 6-5。

表 6-5 某些 snRNA 的特性

RNA	功能	丰度（拷贝数/细胞）	RNA 聚合酶
存在于核质中			
U1	前 mRNA 的剪接	1×10^6	II
U2	前 mRNA 的剪接	5×10^5	II
U4	前 mRNA 的剪接	2×10^5	II
U5	前 mRNA 的剪接	2×10^5	II
U6	前 mRNA 的剪接	4×10^5	III
U7	组蛋白前 mRNA 剪接	5×10^3	II
U11	功能未知	1×10^4	II
U12	功能未知	5×10^3	II
7SK	功能未知	2×10^5	III
存在于核仁			
U3	前 rRNA 的加工	2×10^5	II（植物中则为 III）
U8	功能未知	4×10^4	II
U13	功能未知	1×10^4	II

6.4.1.2 反义 RNA 与蛋白质合成的抑制

反义 RNA（antisense RNA）是指与 mRNA 互补的 RNA 分子，也包括与其他 RNA 互补的 RNA 分子。由于核糖体不能翻译双链的 RNA，所以反义 RNA 与 mRNA 互补结合，即抑制了该 mRNA 的翻译。通过反义 RNA 控制 mRNA 的翻译是原核生物基因表达调控的一种方式，最早是在 *E. coli* 的产肠杆菌素的 ColE1 质粒中发现的，许多实验证明在真核生物中也存在反义 RNA。近几年来通过人工合成反义 RNA 的基因，并将其导入细胞内转录成反义 RNA，即能抑制某特定基因的表达，阻断该基因的功能，有助于了解该基因对细胞生长和分化的作用。

细胞中反义 RNA 的来源有两种途径：第一是反向转录的产物。在多数情况下，反义 RNA 是特定靶基因互补链的反向转录产物，即产生 mRNA 和反义 RNA 的 DNA 是同一区段的互补链。第二种来源是不同基因产物，如 *ompF*（osmotic protein F，渗透蛋白）F 基因是大肠杆菌的膜蛋白基因，与透性有关，其反义基因 *micF* 则为另一基因。

原核细胞中发现的反义 RNA，根据其作用方式分为 3 类。

I 类反义 RNA。这类 RNA 直接作用于其靶 mRNA 的 SD 序列和（或）编码区，引起翻译的直接抑制（1A 类）；或与靶 mRNA 结合后引起该双链 RNA 分子对 RNA 酶 III 的敏感性增加，使其降解（1B 类）。

II 类反义 RNA。此类反义 RNA 与 mRNA 的 SD 序列的上游非编码区结合，从而抑制靶 mRNA 的翻译功能，其作用机理尚不清楚，可能是反义 RNA 与靶 mRNA 上游序列结合后，会引起核糖体结合位点区域的二级结构发生改变，从而抑制了与核糖体的结合。

III 类反义 RNA。此类反义 RNA 可直接抑制靶 mRNA 的转录。如转录抑制复合物 RNA（transcription inhibitory complementary RNA，tic RNA）是大肠杆菌中 CAP 蛋白（cAMP 结合蛋白）的 mRNA 的反义 RNA。ticRNA 基因的启动子可被 cAMP-CAP 复合物所激活，从 CAP mRNA 的转录起始位点上游 3 个核苷酸处开始，以 CAP mRNA 的模板 DNA 链的互补链为模板，合成 ticRNA。ticRNA 的具体长度不清楚，但是它的 5′端一段正好和 CAP mRNA 的 5′端有不完全互补，可以形成 RNA 双链杂合体。而在 CAP mRNA 上紧随杂交区之后的是一段约长 11bp 的 A·U 丰富区。这样的结构与 ρ 因子不依赖性的转录终止子的结构十分相似，可以使 CAP mRNA 的转录刚刚开始不久即迅速终止。这一例子是 CAP 蛋白合成的自我调节的最好说明。当 CAP 合成达到一定量之后，即与 cAMP 结合形成 cAMP-CAP 复合物，再激活 ticRNA 的启动子转录出 ticRNA，反过来抑制 CAP-mRNA 的合成。

6.4.1.3 反义 snRNA 在前 rRNA 加工中的作用

研究表明，在真核生物的前 rRNA 加工中，需要大量的 snRNA 的帮助。细胞核中的 snRNA 通常与特定的蛋白质包裹在一起形成颗粒结构，称为核小核糖核蛋白（small nucleolar ribonucleoprotein，snRNP）。电子显微镜观察发现：在 rRNA 没有转录完全时，snRNA 就与前 rRNA 结合在一起了。最早与前 RNA 结合的是含有 U3 的 RNP 颗粒，这种颗粒主要是结合在前 rRNA 的 5′端，在转录后的加工中，由这种 RNP 将 5′端的转录物切除。

U3 和其他几种 snRNA 由于拷贝数高（10^6 拷贝/细胞），所以发现较早。后来又陆续发

现一些低拷贝的 snRNA（10^4 拷贝/细胞），它们的长度为 10～21 个核苷酸，并且能够与 rRNA 转录物的特定序列互补，所以属于反义 snRNA。这些 snRNA 与前 rRNA 通过互补形成的 RNA-RNA 双链部分可作为前 rRNA 进行加工修饰的标志（图 6-26）。

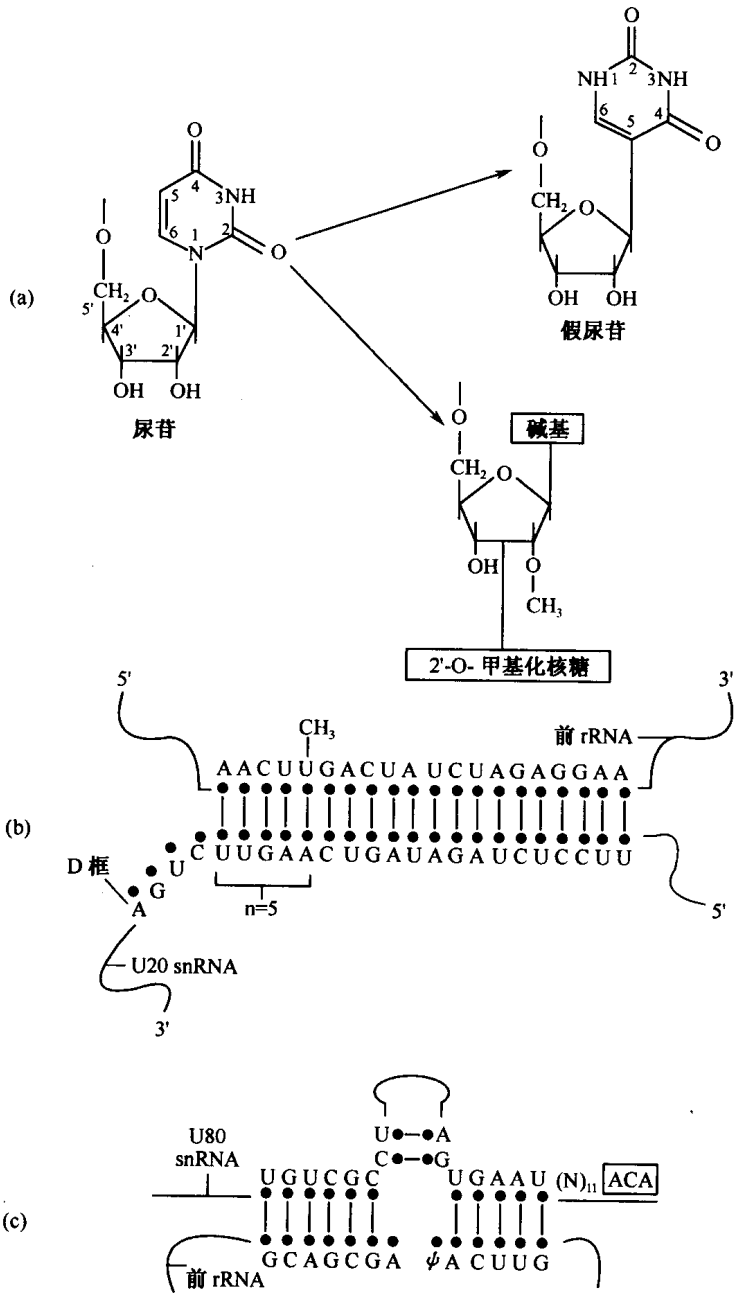


图 6-26　前 rRNA 的修饰（引自 Karp, 1999）

(a) 在前 rRNA 分子中最常见的修饰是将尿苷转变成假尿苷和在核糖的 2′位进行甲基化。为了将尿苷转变成假尿苷，必须切开 N1-C1′键，并将尿嘧啶环旋转 180°，使 C5 与核糖的 C1′共价连接；(b) U20 snRNA 与前 rRNA 形成部分双链，导致 2′核糖甲基化。在任何情况下，甲基化的部位都是与 snRNA 氢键连接的前 rRNA 第 5 位的尿嘧啶（从 snRNA D 框开始），D 框是 snRNA 中含有固定的 CUGA 的序列部分，它的作用是指导前 rRNA 的甲基化；(c) U80 snRNA 与前 rRNA 形成部分双链，指导将尿苷转变成假尿苷（ψ）。假尿苷的形成也是在固定的位置，同 snRNA 的发夹结构有关。指导假尿苷形成的 snRNA 都有相同的 3′端：ACA。

根据反义 snRNA 的功能和序列的相似性将它们分成两类：①C/D 框 snRNA（box C/D snRNA），这类 snRNA 的 5′端有 C/D 框结构，它们的功能是决定何种核苷的核糖甲基化；②H/HAC框 snRNA，这类反义 snRNA 的 3′端有 HAC 序列，它们的作用是决定哪些尿苷被转变成假尿苷。

据估计，细胞核中有 200 多种不同的反义 snRNA，它们分别引导前 RNA 中不同位点的甲基化或假尿苷化。如果有一种编码反义 snRNA 的基因被缺失，前 RNA 中就会有一个位点不能被酶促修饰。

6.4.2 核　酶

核酶一词用于描述具有催化活性的 RNA，即化学本质是核糖核酸（RNA），却具有酶的催化功能。核酶的作用底物可以是不同的分子，有些作用底物就是同一 RNA 分子中的某些部分。核酶的功能很多，有的能够切割 RNA，有的能够切割 DNA，有些还具有 RNA 连接酶、磷酸酶等活性。与蛋白质酶相比，核酶的催化效率较低，是一种较为原始的催化酶。

6.4.2.1 核酶的发现

在大多数真核生物的 RNA 加工中，从前 RNA 中切除的序列都是间隔区（spacer）而不是内含子，所谓间隔区就是位于编码基因间的序列而不是位于基因内的序列。但是在某些原生动物，如四膜虫的编码核糖体大亚基 26S rRNA（相当于高等生物的 28S rRNA）的基因中有一个 413 个碱基的内含子（intron）。所谓内含子是基因内的间隔序列，它不出现在成熟的 RNA 分子中，也就是说在转录后要通过加工被切除。与内含子相对应的是外显子（exon），即最后出现在成熟 RNA 中的序列。1981 年，Cech 和他的同事在研究四膜虫的 26S 前 rRNA 加工去除基因内含子时获得一个惊奇的发现：内含子的切除反应发生在仅含有核苷酸和纯化的 26S 前 rRNA 而不含有任何蛋白质催化剂的溶液中，可能的解释只能是：内含子切除是由 26S 前 rRNA 自身催化的，而不是蛋白质。为了证明这一发现，他们将编码 26S 前 rRNA 的

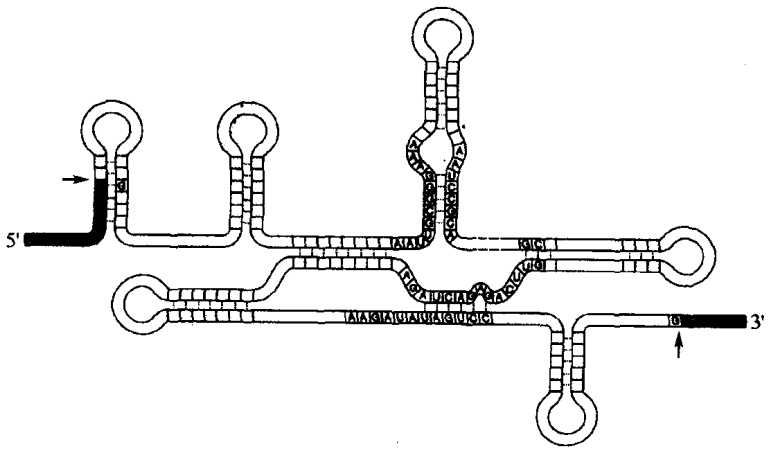


图 6-27　四膜虫 26S 前 rRNA 内含子的二级结构以及内含子、外显子的剪接点（如箭头所指）（引自 Wolfe，1993）

DNA克隆到细菌中并在无细胞系统中转录成26S前rRNA分子。结果发现这种人工制备的26S前rRNA分子在没有任何蛋白质催化剂存在的情况下，切除了前体分子中的内含子。这种现象称为自剪接（self-splicing），这是人类第一次发现RNA具有催化化学反应的活性，具有这种催化活性的RNA称为核酶。这一发现之后不久，在酵母和真菌的线粒体前mRNA和前tRNA加工、叶绿体的tRNA和前rRNA加工、某些细菌病毒的前mRNA加工中都发现了自剪接现象。Cech因发现了核酶而获得1989年诺贝尔化学奖。图6-27所示是四膜虫26S前rRNA的内含子的二级结构以及内含子与外显子的剪接点。

6.4.2.2 50S核糖体中23S rRNA的核酶活性

在蛋白质合成过程中，肽键的形成是由肽酰转移酶（peptidyl transferase）催化的。它催化核糖体A位点tRNA上末端氨基酸的氨基与P位肽酰-tRNA上氨基酸的羧基间形成肽键。其结果，使A位点的氨酰-tRNA上的多肽延长了一个氨基酸，而P位点的氨酰-tRNA形成脱氨酰-tRNA（图6-28）。

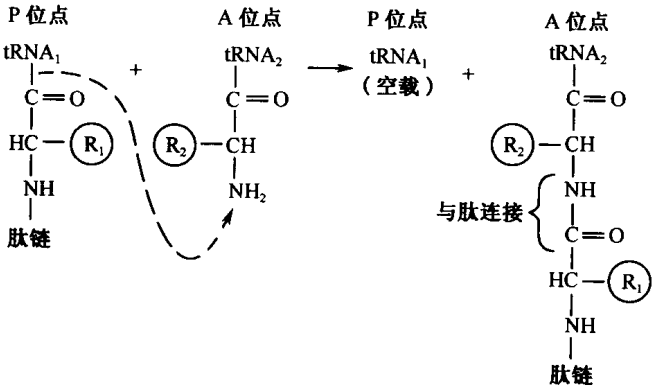


图6-28 核糖体A位点和P位点氨基酸间肽键的形成
R_1和R_2分别表示氨基酸上不同的侧链。

多年来一直把催化氨基酸间肽键形成的反应看成是由核糖体蛋白完成的，但不能确定是何种蛋白质。1992年，Noller和他的同事用蛋白酶K、SDS以及苯酚等去垢剂处理大肠杆菌核糖体的50S亚基，将所有的蛋白质都破坏后，仍然具有肽酰转移酶的活性。与此不同的是，用核酸酶处理核糖体50S亚基，将rRNA降解后，肽酰转移酶的活性也随之消失。这些结果提示是RNA而不是蛋白质具有催化肽键形成的作用。在细菌核糖体中，已确定23S rRNA分子中具有肽酰转移酶活性的区域。

6.4.2.3 核酶的类型

核酶的发现在生命科学中具有重要意义，在进化上使我们有理由推测早期遗传信息和遗传信息功能体现者是一体的，只是在进化的某一进程中蛋白质和核酸分别执行不同的功能。核酶的发现为临床的基因治疗提供了一种手段，具有重要的应用前景。核酶的种类很多，现在有许多工程核酶。根据核酶的结构和催化反应可分为3种类型。

RNA和蛋白质复合物 核糖核酸酶P（ribonuclease P）是一种核糖核蛋白，含有一个

单链 RNA 分子，长度为 375 个碱基，结合一个分子质量为 20kDa 的多肽（119 个氨基酸残基）。RNA 具有催化切割 tRNA 的能力，蛋白质则起间接的作用，可能是维持 RNA 结构的稳定。该酶广泛存在于原核生物和真核生物（核仁、叶绿体和线粒体）中，也参与核糖体 RNA 的加工。

小分子的 RNA　各种具有催化作用的小分子 RNA，能够进行分子内自剪接反应，且不需蛋白质参与。这些 RNA 分子可以分为两个部分，一部分是底物，另一部分是酶。将具有酶活性的序列克隆后可制成人工核酶去作用于独立的底物。

I、II 型内含子　这两种核酶具有将自身从前 mRNA 中剪接出去的作用。体外实验证明这种剪接反应仅仅是 RNA 本身就可以了，但是在体内，需要有辅助蛋白的参与。

上述 3 种类型的核酶都有一个共同的特点，即都涉及磷酸二酯键的切割或连接。它们作用的底物是 RNA，可以是 RNA 分子本身，也可以是别的 RNA 分子。

6.4.3　内含子的切除：核酶的作用机制

除了前 rRNA 中有内含子，tRNA 和前 mRNA 中都有内含子的存在，这些内含子都要通过加工被切除后才能得到成熟的 rRNA、tRNA 或 mRNA。虽然这些 RNA 中内含子切除的机制各不相同，但都涉及到核酶的作用。

6.4.3.1　核剪接

真核生物的结构基因中一般都含有内含子，转录后，从前 mRNA 中将内含子切除，然后将外显子重新连接成一个成熟的 mRNA 的过程称为 RNA 剪接（RNA splicing）（图 6-29）。结

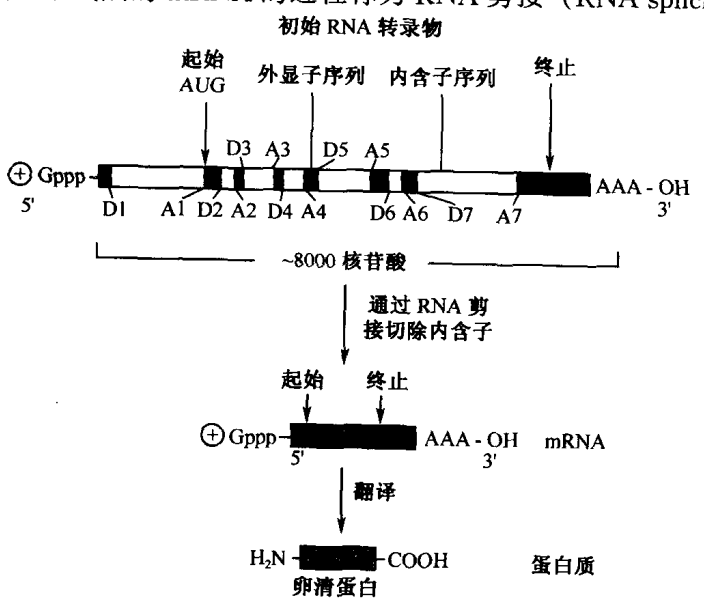


图 6-29　鸡的卵清蛋白基因初始 RNA 转录物的剪接（引自 Alberts *et al.*，1994）
鸡的卵清蛋白基因中有 7 个内含子，转录后需要被切除，8 个外显子连接起来形成有功能的 mRNA。

构基因中内含子的剪接发生在细胞核中，再将加工成熟的 mRNA 运送到细胞质中并在细胞质核糖体上进行蛋白质合成。

核剪接（nuclear splicing）是指发生在细胞核中，主要是对 hnRNA 中内含子的剪接。这种剪接有 3 个主要特点：一是在前 mRNA 中内含子与外显子间有特征性序列，即 GU-AG 规则；第二是剪接过程中需要 snRNA 参与，并要形成剪接体；第三要形成套索结构。

GU-AG 规则（GU-AG rule）　前 RNA 中参与内含子剪接的两个特殊位点，即在内含子和外显子交界处有两个相当短的保守序列：5′端为 GU，3′端为 AG，称为 GU-AG 规律。GU-AG 规则主要适用于（或是全部）真核生物基因的剪接位点。说明内含子的切除有一共同的机制。应指出的是：这种保守性不适用于线粒体、叶绿体和酵母 tRNA 基因转录后的加工。

剪接体（spliceosome）　在剪接过程中形成的剪接复合物称为剪接体，剪接体的主要组成是蛋白质和小分子的核 RNA（snRNA）。复合物的沉降系数约为 50～60S，它是在剪接过程的各个阶段随着 snRNA 的加入而形成的。也就是说在完整的前 mRNA 上形成的一个剪接中间体。

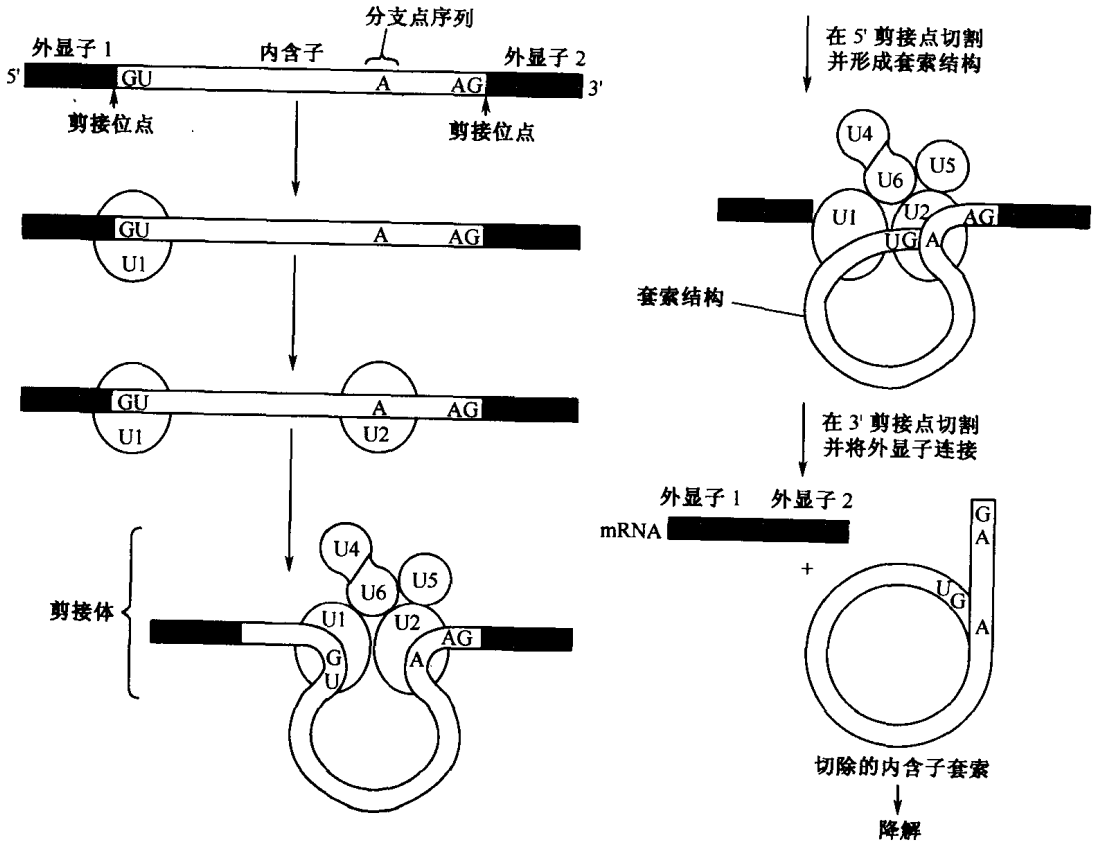


图 6-30　前 mRNA 剪接的套索模型

RNA 的剪接是由装配成的 snRNP 和一些蛋白质催化的。snRNP 复合物的功能之一是将内含子的两端引导到一起，以便发生反应。snRNP 装配之后，内含子序列中一个特别的腺苷附着到 5′剪接位点，然后在该处将 RNA 骨架的糖-磷酸键切开。切开的内含子的 5′端与腺苷共价相连，在 RNA 分子中形成一个环，称为套索。第一个外显子自由的 3′-OH 端与第二个外显子的起始端相互作用，在 3′端切下内含子，同时将两个外显子连接起来。剪接反应的结果，使两个外显子连成一个连续的序列，内含子则被释放。

剪接体的装配同核糖体的装配相似。依靠 RNA-RNA、RNA-蛋白质、蛋白质-蛋白质等3方面的相互作用。可能比核糖体更复杂，要涉及 snRNA 的碱基配对，相互识别等。

套索的形成和释放　内含子的剪接分为两个主要的阶段。第一阶段是从内含子的 5′端开始切割，将左边的外显子与右边的内含子-外显子分开，左边的外显子是一个线性分子，右边的内含子-外显子形成一个套索（lariat）结构，在套索结构中，内含子的 5′端同内含子右侧一个碱基相连形成一个环。第二个阶段是在剪接位点的 3′端切割，释放套索中的内含子，同时右边的外显子与左边的外显子连接起来，切割和连接反应不是独立的，而是协同进行的。在套索模型中要形成剪接体，是由 U1 snRNP、U2 snRNP、U4/U6 snRNP、U5 snRNP 和某些非 snRNP 因子协同装配的（图 6-30）。

6.4.3.2　I 组、II 组内含子的剪接

这两种类型的内含子的二级结构比较特别，有很多柄环结构（图 6-31），反映在它们的序列中存在反向重复序列。

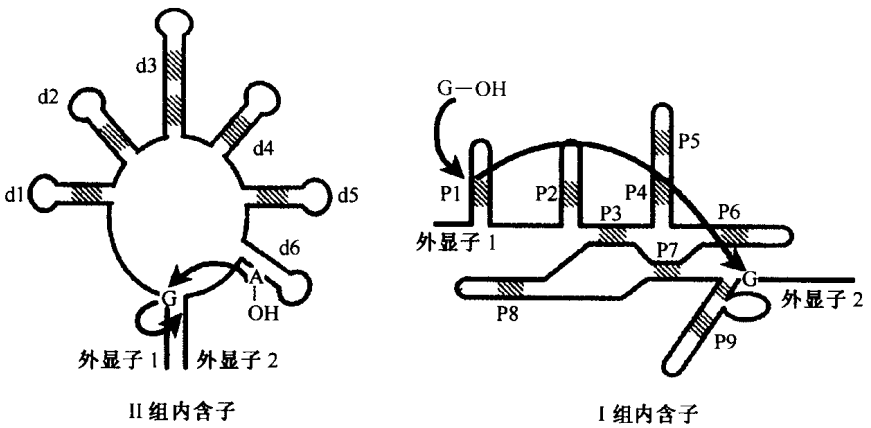


图 6-31　I 组和 II 组内含子的二级结构（引自 Lewin，1998）

I 组内含子（group I intron）　一类具有酶催化功能的内含子，转录成 RNA 后，可以自剪接。此类内含子转录后可以形成 9 个由碱基配对形成的特定二级结构，分别命名为 P1 至 P9，P1 和 P7 是保守的。I 组内含子在剪接反应中，需要游离的鸟苷作辅助因子。反应的第一步是 G 结合到内含子的 5′剪接点，从而将 5′剪接点切开，形成一个在 5′端添加有 G 的线性中间体。当线性的内含子形成环状时，内含子的 3′剪接点被切开，两个外显子相连。

II 组内含子（group II intron）　从结构上看，II 组内含子的 6 个结构域可形成发夹环，结构域 5 与 6 之间只间隔 3 个碱基，结构域 6 参与转酯作用。II 组内含子同样具有自剪接的功能，它的剪接位点类似于核编码结构基因的内含子，并同样遵从 GU-AG 规律。II 组内含子的剪接又不完全与核内含子的剪接相同，它不需要剪接体和 snRNA 的参与，但要形成一个套索的中间体。II 组内含子自剪接的第一步通过内含子中的一个腺苷与 5′剪接点反应从而将 5′剪接点切开，并形成一个套索中间体。第二步是将内含子的 3′剪接点切开，两个外显子相连，释放套索结构。

图 6-32 是 I 组内含子和 II 组内含子自剪接的示意图。

I 组内含子和 II 组内含子之间没有什么关系，只不过自剪接的作用机制不同。I 组内含子存在于某些生物的细胞核、线粒体和叶绿体中编码 rRNA、mRNA 和 tRNA 的基因中；II 组内含子一般存在于真菌、藻类和植物的线粒体和叶绿体的 mRNA 的初级转录物中。所以 I 组内含子比 II 组内含子更普遍。

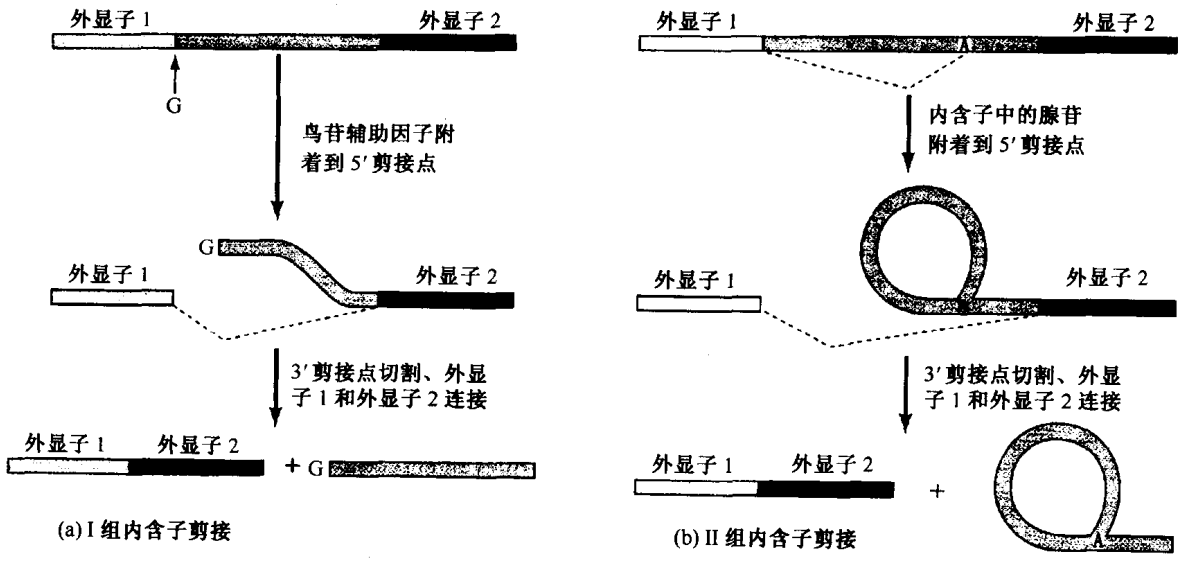


图 6-32　I 组内含子、II 组内含子剪接（引自 Cooper, 2000）

从上面的讨论中，我们已经了解到核酶具有核酸酶和肽基转移酶的活性，此外核酶还具有 RNA 连接酶、磷酸酶和内切核酸酶的活性，在此不一一介绍。

6.4.4　RNA 编辑

RNA 编辑（RNA editing）是指在 mRNA 水平上改变遗传信息的过程。RNA 编辑是通过比较成熟的 mRNA 与相应基因的编码信息时发现的，成熟的 mRNA 序列中有几种意想不到的变化，包括 U→C、C→U 的改变；U 的插入或缺失、多个 G 或 C 的插入等。最典型的例子是锥虫（trypanosome）动基体（kinetoplast）的线粒体基因 mRNA 的编辑，涉及上百个 U 的缺失和添加。

6.4.4.1　RNA 编辑的意义

由于 RNA 编辑是基因转录后在 mRNA 中插入、缺失或核苷酸的替换而改变 DNA 模板来源的遗传信息，翻译出多种氨基酸序列不同的蛋白质，RNA 编辑的结果不仅扩大了遗传信息，而且使生物更好地适应生存环境。有些基因的主要转录产物必须经过编辑才能有效地起始翻译，或产生正确的可读框（ORF），如锥虫动质体 ATPase－6 的前 mRNA 中，需要向导 RNA 通过碱基配对在其 3′区增添 447 个尿苷并删除 28 个尿苷才能形成成熟的 mRNA；此外 physarm 绒泡菌基因组中存在 ATP 合成酶 α 亚基的隐蔽基因，其转录产物中有 54 处在插入单个的 C 后，才能形成成熟 mRNA 的正确可读框。这些 C 大多插入于嘌呤-嘧啶二核苷酸

（RY）的3′侧，且有78%的插入在密码子的简并位上，因此有88%的RYC密码子是通过编辑产生的。

锥虫线粒体的细胞色素氧化酶亚基II的基因与人类基因相比在相当于编码第170位氨基酸处有一个移码突变，然而在其基因转录产物中却由于4个U的插入恢复了相应的ORF，因而能够合成相应功能的蛋白质，由此提示RNA编辑是基因表达的一种重要的调控机制。

6.4.4.2 指导RNA在编辑中的作用

RNA编辑的机制是什么？如何控制编辑位点的特异性？研究发现指导RNA（guide RNA，gRNA）在RNA编辑中起重要作用。gRNA长度大约是60～80个核苷酸，是由单独的基因转录的，具有3′寡聚U的尾巴，中间有一段与被编辑mRNA精确互补的序列，5′端是一个锚定序列，它同预编辑的mRNA序列互补。在编辑时，形成一个编辑体（editosome），以gRNA内部的序列作为模板进行转录物的校正，同时产生编辑的mRNA。有趣的是，gRNA的3′端的oligoU尾竟是被添加的U的供体（图6-33）。

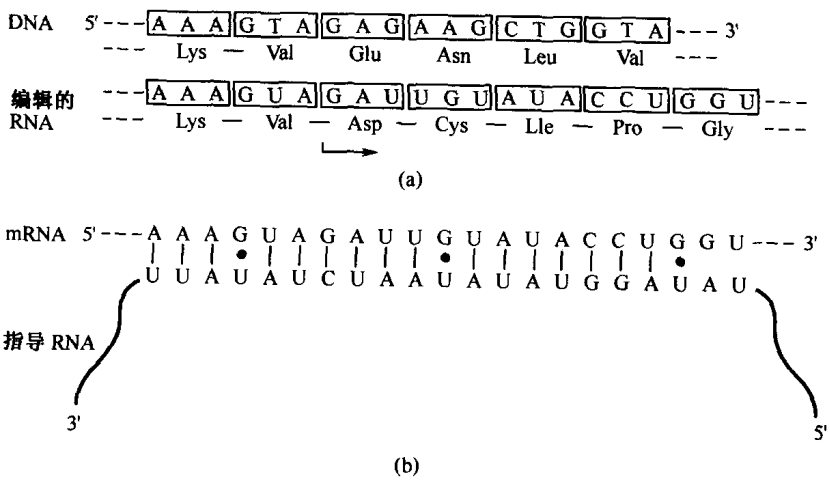


图6-33 gRNA指导 *Prytanosoma brucei* 线粒体细胞色素氧化酶亚基II基因转录物的编辑（引自Nelson *et al*.，2000）

（a）四个U的插入；（b）在编辑过程中，gRNA的模板作用

载脂蛋白B（apolipoprotein B，apoB），apoB基因的mRNA是通过RNA编辑合成不同蛋白的最好例子。人的载脂蛋白有两种表达形式：apoB-48和apoB-100。该基因的序列在肝、肠组织细胞中是相同的，但产物不同。在肝细胞中，产物为4563个氨基酸残基的肽：apoB-100；但在肠细胞中，产物为只含2 152个氨基酸残基的apoB-48，缺失了apoB-100的N端同LDL受体结合的结构域。原因是在mRNA水平上将2153位的谷氨酰胺的密码子CAA中的C编辑成为U，形成一个终止密码子——UAA（图6-34），结果使蛋白质的合成提前终止，合成一个新的分子质量约为250kDa的蛋白质。

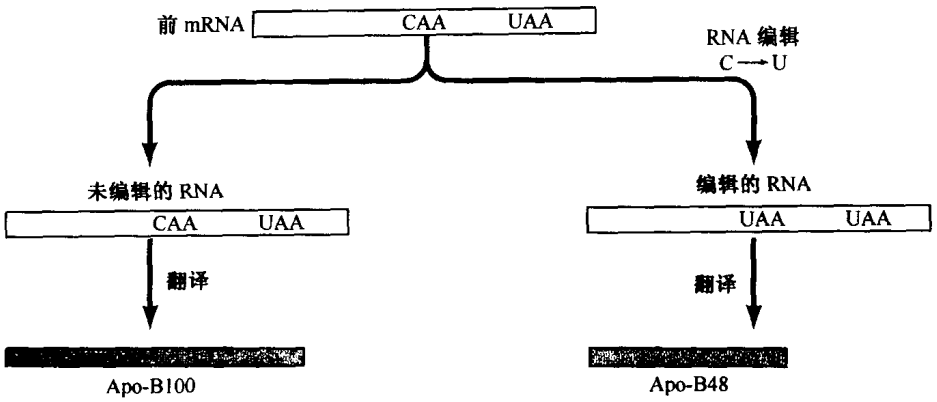


图 6-34 载脂蛋白 mRNA 的编辑（引自 Cooper，2000）

提 要

核糖体是细胞内一种核糖核蛋白颗粒，含有 rRNA 和 r 蛋白质。核糖体可分为真核生物核糖体和原核生物核糖体，前者有细胞质核糖体、线粒体核糖体和叶绿体核糖体 3 种类型。核糖体均由大小两个亚基组成，进行蛋白质合成时才结合在一起。原核生物核糖体沉降系数为 70S，由 50S 大亚基（含 33 种不同的蛋白质以及 23S 和 5S rRNA）和 30S 小亚基（含 21 种蛋白质以及 16S rRNA）组成；真核生物核糖体沉降系数为 80S，由 60S 大亚基（含大约 49 种蛋白质以及 28S、5S 和 5.8S rRNA）和 40S 小亚基（含大约 33 种蛋白质以及 18S rRNA）组成。

核糖体的生物发生包括蛋白质和 rRNA 的合成、核糖体亚基的组装等。真核生物的 18S、5.8S、28S rRNA 基因组成一个转录单位，转录成一个 45S 的前体。原核生物的 16S、23S、5S 3 种 rRNA 基因组成一个转录单位。真核生物核糖体亚基在核仁中装配，原核生物核糖体亚基在细胞质中装配。

核糖体的功能是进行蛋白质多肽链的合成。核糖体中有一个 mRNA 结合位点和 3 个 tRNA 结合位点：A 位点、P 位点、E 位点。原核生物 mRNA 通过 5′端的 SD 序列与核糖体 16S rRNA 结合，真核生物则依赖于 mRNA 5′端甲基化帽子结构将 mRNA 与核糖体小亚基结合。多肽链的合成分为起始、延伸和终止 3 个不同过程。蛋白质合成过程中可以形成多聚核糖体。

小分子 RNA 可分为 snRNA 和 scRNA，前者存在于细胞核中，后者存在于细胞质中。反义 RNA 是与 mRNA 或其他 RNA 互补的 RNA 分子，来源于反向转录的产物或是不同基因的产物。可分为 I 类、II 类、III 类反义 RNA。

核酶是具有催化活性的 RNA，分为 RNA 和蛋白质复合物、小分子的 RNA 和 I、II 组内含子三种类型。核剪接涉及核酶的作用，具有 GU-AG 规则、装配成剪接体、形成套索结构等 3 个特点。I、II 组内含子的剪接机制完全不同。

RNA 编辑是指在 mRNA 水平上改变遗传信息的过程，涉及指导 RNA 的作用。

7 线粒体与过氧化物酶体

细胞的生存需要两个基本的要素：构成细胞结构的化学元件和能量。生物从食物中获取能量，根据对氧的需要情况分为两种类型：厌氧的，即不需要氧；好氧的，即需要氧的参与。在真核生物中，需氧的能量转化过程与线粒体有关，并且伴随着一系列的化学反应；而在原核生物中，能量转化与细胞质膜相关。

线粒体（mitochondria）是 1850 年发现，1898 年命名的；是细胞内氧化磷酸化和形成 ATP 的主要场所（图 7-1），有细胞“动力工厂”（power plant）之称。另外，线粒体有自身的 DNA 和遗传体系，但线粒体基因组的基因数量有限，因此，线粒体只是一种半自主性的细胞器。

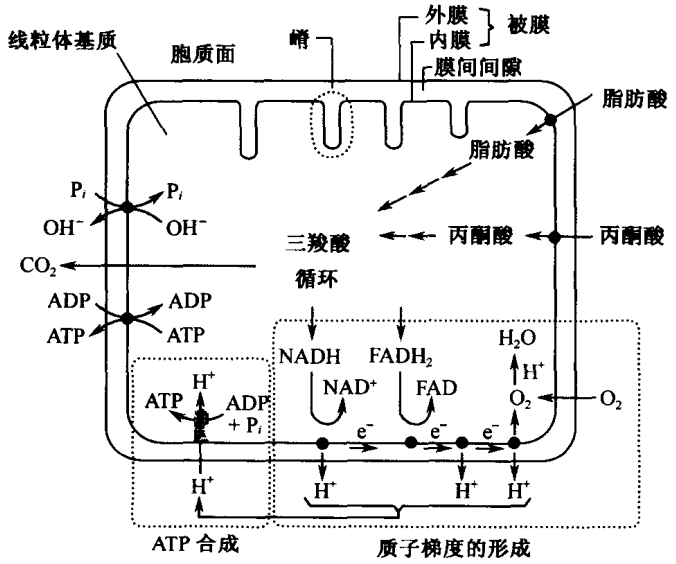


图 7-1 线粒体结构及功能示意图（引自 Alberts *et al*., 1998）

过氧化物酶体是细胞内另一个需要氧的细胞器，不过过氧化物酶体需要氧不是用于 ATP 的合成而是用于有毒物质的氧化，对线粒体具有氧调节作用。另外，过氧化物酶体的生物发生与线粒体类似。

7.1 线粒体的形态结构

线粒体是能够在光学显微镜进行观察的显微结构，它具有渗透性，在低渗溶液中会膨胀，而在高渗溶液中能够收缩。

7.1.1 线粒体的发现与功能研究

人们对线粒体的研究有一个多世纪的历史。1850 年，德国生物学家 Kölliker 第一个系统地研究了线粒体，发现在肌细胞的细胞质中存在着一种规则排列的颗粒，并且从肌细胞中分离到这些颗粒，发现将它们放置在水中能够膨胀，为此推测：这种颗粒是由半透性的膜包被的。很快，在其他一些组织的细胞中也发现了这种颗粒，并取了很多不同的名称。1898 年，有人首次将这种颗粒命名为线粒体，意思是“类似线状的颗粒”（thread-like granule），并很快被大家所接受。

1900 年，Michaelis 在线粒体的功能研究方面取得了突破性的进展。他用染料 Janus green 对肝细胞进行染色，这种染料将线粒体染成绿色。当细胞消耗氧之后，线粒体的颜色逐渐消失了，当时已经了解这种颜色的变化是颜料的氧化还原状态改变的结果，从而提示线粒体具有氧化还原反应的作用。1913 年，Warburg 从细胞匀浆质中分离了线粒体，并发现它能够消耗氧。但是，这些发现当时并没有引起生物学家足够的重视，因为人们普遍认为线粒体的作用主要是参与分化细胞遗传特性的转变。

人们真正注意线粒体在能量代谢中的作用是分离纯化方法的发展和线粒体独立功能的研究。在 20 世纪 40 年代早期，Claude 开创了细胞组分分离技术，能够将线粒体与其他细胞组分分开。但他所用的是盐法，而盐会破坏线粒体的作用，所以用这种方法分离的线粒体看不到有关 Krebs 循环以及呼吸链的成分。1948 年，Hogeboom、Schneider 和 Palade 等终于分离到具有生物活性的线粒体，他们采用的分离介质是蔗糖而不是盐，因此不会破坏线粒体。分离方法上的突破，使得 Kenedy 和 Lehninger 证明了线粒体具有 Krebs 循环、电子传递、氧化磷酸化的作用，从而证明了线粒体是真核生物进行能量转换的主要部位。

7.1.2 线粒体的形态与分布

虽然按线粒体的名称，线粒体应是线粒状的颗粒，实际上线粒体的形状多种多样，一般呈线状（图 7-2），也有粒状或短线状。线粒体的直径一般在 0.5～1.0μm，在长度上变化很大，一般为 1.5～3μm，长的可达 10μm，人的成纤维细胞的线粒体则更长，可达 40μm。不同组织在不同条件下有时会出现体积异常膨大的线粒体，称为巨形线粒体（megamitochondria）。

在不同类型的细胞中线粒体的数目相差很大，但在同一类型的细胞中数目相对稳定。有些细胞中只有一个线粒体，有些则有几十、几百、甚至几千个线粒体。在代谢活跃的细胞中，线粒体的数量多，如肝细胞中有 500～1 000 个。代谢率低，耗能少的细胞线粒体数目少，如精子细胞、淋巴细胞等一般少于 100 个。细胞在不同的功能状态下，线粒体的数目也会变化，如唾液腺细胞在分泌活动旺盛时线粒体的数目增多，红细胞成熟时则没有线粒体。

一般情况下，植物细胞的线粒体数目比动物细胞少，这是因为植物细胞的叶绿体代替了线粒体的某些功能。

在多数细胞中，线粒体均匀分布在整个细胞质中，但在某些细胞中，线粒体的分布是不均一的，有时线粒体聚集在细胞质的边缘。在细胞质中，线粒体常常集中在代谢活跃的区域，

因为这些区域需要较多的 ATP，如肌细胞的肌纤维中有很多线粒体。另外，在精细胞、鞭毛、纤毛和肾小管细胞的基部都是线粒体分布较多的地方。由于线粒体具有自由运动的特性，所以能向细胞需能的部位转移，或者固定在需能部位的附近，以便运送 ATP。线粒体除了较多分布在需要 ATP 的区域外，也较为集中分布在有较多氧化反应底物的区域，如脂肪滴（图 7-3），因为脂肪滴中有许多要被氧化的脂肪。

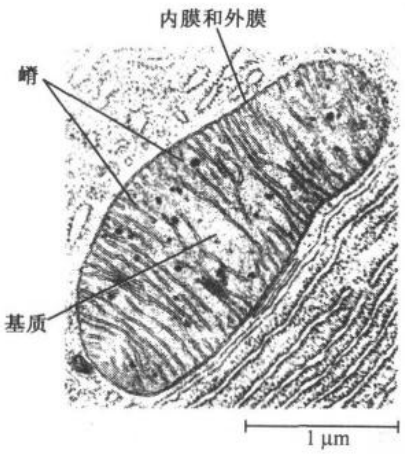


图 7-2　电子显微镜观察的蝙蝠胰腺细胞线粒体（引自 Becker *et al*., 1996）

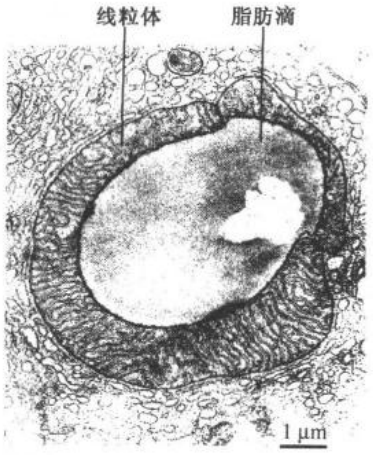


图 7-3 线粒体包围着脂肪滴，内有大量要被氧化的脂肪（引自 Becker *et al*., 1996）

线粒体在细胞中并非都是单个存在的，有时可形成由几个线粒体构成的网络结构，因为有些线粒体具有分支，可以相互交错在一起。如通过相差显微镜检查完整的肝细胞，发现线粒体并非是单个存在的，而是以交织的网络状态存在（图 7-4）。这一研究结果揭示肝细胞中有大量分支的线粒体，并以动态状态存在。在这种结构中一个线粒体的一部分常与其他的线粒体融合在一起。

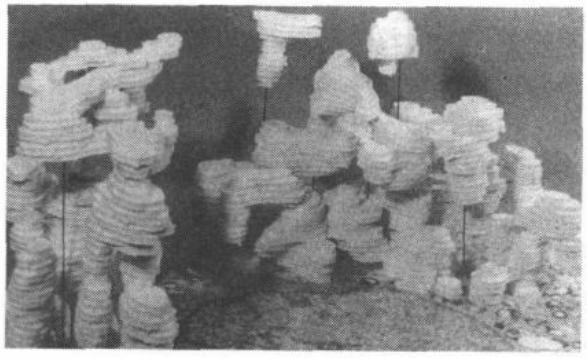


图 7-4　细胞中线粒体分支交织连接而成的网状二维结构（引自 Becker *et al*., 1996）

另外，在显微镜下检查用细胞匀浆技术从细胞匀浆液中分离的线粒体样品时，常常观察到大小均一的单个球形线粒体，这些线粒体可能是在分离过程中人工造成的分支线粒体断裂而成的球形颗粒。这种由分支线粒体断裂形成小球状颗粒的现象与分离内质网时形成的微粒体极为相似。

7.2 线粒体的结构与化学组成

7.2.1 线粒体的结构

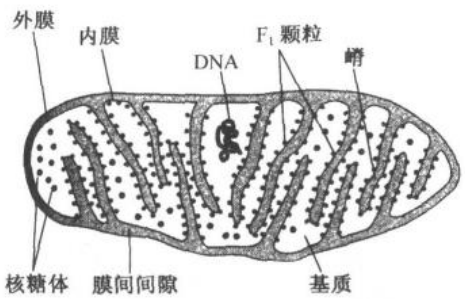


图 7-5 线粒体结构模式图
（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

线粒体由内、外两层彼此平行和高度特化的膜包围而成，内外膜都是典型的单位膜。线粒体外膜（outer membrane）起界膜作用，线粒体内膜（inner membrane）向内皱褶形成嵴（cristae），嵴上有一些颗粒朝向线粒体基质，这些颗粒称为 F_1 颗粒（F_1 particle），似把手状。线粒体的外膜和内膜将线粒体分成两个不同的区室：一个是膜间间隙（intermembrane space），是两个膜之间的空隙；另一个是线粒体基质（matrix），它是由内膜包裹的空间（图 7-5）。

7.2.2 线粒体膜的通透性

很早就认识到线粒体的膜具有半透性，通过对半透性的研究导致线粒体各组分分离方法的建立。

7.2.2.1 线粒体通透性研究

用分离的线粒体研究线粒体的通透性。将完整的线粒体放在含有不同溶质的溶液中，然后测量线粒体对这些物质的渗透情况，发现大多数的盐、糖、核苷和辅酶能够快速地进入线粒体，但是它们在线粒体内的最终浓度通常要比溶液中的浓度低，说明线粒体中只有部分区域能够接收外部环境中的溶质。例如将线粒体放在 100 mmol·L^{-1}蔗糖溶液中，蔗糖穿过外膜进入线粒体的膜间间隙；然后将线粒体取出测定线粒体内部蔗糖的平均浓度，结果只有 50mmol·L^{-1}，比环境中蔗糖的浓度低。据此推测：线粒体外膜对蔗糖是通透的，而内膜对蔗糖是不通透的。由于测得的是线粒体内蔗糖的平均浓度，可以进一步推测线粒体中可流动的

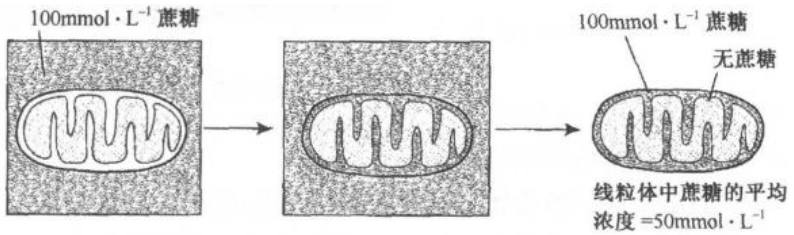


图 7-6 线粒体通透性测定（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）
左：将线粒体置于含有 100 mmol·L^{-1}的蔗糖溶液中；中：蔗糖穿过线粒体外膜，达到平衡；
右：将线粒体从蔗糖溶液中取出，测定线粒体中蔗糖的浓度。

液体有一半在膜间间隙，膜间间隙中蔗糖的浓度为 100mmol·L^{-1}，另外一半流动液在线粒体基质中，并且不含蔗糖，那么整个线粒体的蔗糖浓度平均就是 50mmol·L^{-1}了（图 7-6）。

7.2.2.2 线粒体各组分的分离

由于线粒体外膜的通透性比内膜高，利用这一性质，Parsons 和他的同事最先建立了分离线粒体内膜、外膜及其他组分的方法（图 7-7）。

实验中将线粒体放在低渗溶液或者去垢剂毛地黄皂苷（digitonin）中直到线粒体外膜裂开，随着外膜的破裂，膜间间隙中的物质释放到溶液中，然后通过离心分离内膜、外膜、膜间间隙的物质。可通过电子显微镜将内膜和外膜区分开来：分离的外膜看起来像空的囊，而内膜会形成小泡，称为线粒体质（mitoplast）。用去垢剂 Lubrol 进一步处理线粒体质，能够将内膜和线粒体基质分开，去垢剂 Lubrol 能够破坏内膜。破裂的内膜能够自我封闭形成内膜小泡，这种小泡的外表面含有 F_1 颗粒。

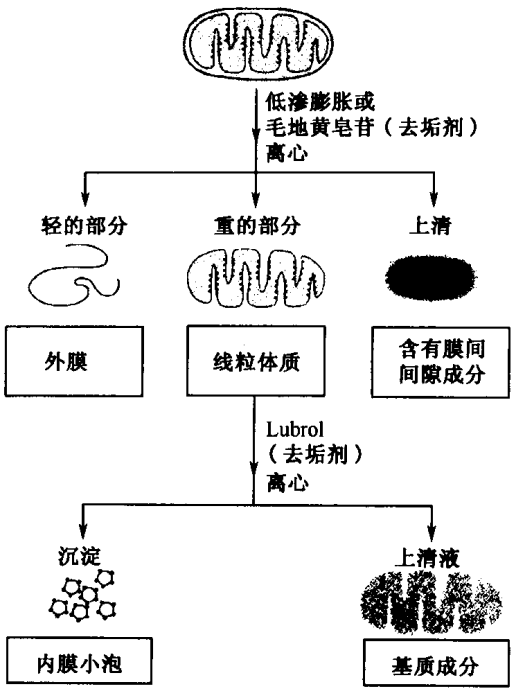


图 7-7 线粒体组分的分离
（引自 Kleinsmith *et al.*，1995）
首先将线粒体置于低渗溶液中使外膜破裂，此时线粒体内膜和基质(线粒体质)仍结合在一起,通过离心可将线粒体质分离。

7.2.3 线粒体各部分的化学组成和特性

7.2.3.1 线粒体的化学组成

经过对线粒体各结构组分的生化分析，发现线粒体的化学组分主要是由蛋白质、脂类、水分等组成。

蛋白质占线粒体干重的 65%～70%。线粒体的蛋白质分为可溶性和不溶性的，可溶性的蛋白质主要是基质的酶和膜的外周蛋白，不溶性的蛋白质构成膜的本体，其中一部分是镶嵌蛋白，也有一些是酶蛋白。

线粒体的脂类只占干重的 20%～30%。在线粒体的脂类中多数是磷脂，占总脂的 3/4 以上。其中以卵磷脂、脑磷脂占多数；还有一定数量的心磷脂，但胆固醇的含量较低。含丰富的心磷脂和较少的胆固醇是线粒体在组成上与细胞其他膜结构的明显差别。

线粒体内、外膜在化学组成上的主要区别是脂类和蛋白质的比例不同，内膜上的脂类与蛋白质的比值低（0.3:1），外膜中的比值较高（接近 1:1）。

从线粒体中已分离出 120 多种酶，组成几十种不同的酶系（如三羧酸循环酶系、氧化磷酸化酶系等），每个酶系至少有 2 000 个重复套，有规则地排列在线粒体的不同部位。

7.2.3.2 线粒体各部分的特性和功能

线粒体由4个部分组成，在能量转换过程中分别起不同的作用。各部分功能的差异主要是化学组成的差异，特别是蛋白质和酶分布的差异（表7-1）。

表7-1 线粒体各部分蛋白的分布

外膜	膜间间隙	内膜	基质
细胞色素 b_5	腺苷酸激酶	NADH脱氢酶	丙酮酸脱氢酶
NADH-细胞色素	核苷	琥珀酸脱氢酶	脂肪酸β氧化酶
还原酶	二磷酸激酶	细胞色素氧化酶	Krebs循环酶系
单胺氧化酶	单磷酸激酶	细胞色素 c	DNA聚合酶
脂酰辅酶A合酶		ATP合酶	RNA聚合酶
磷酸甘油酰基转移酶		(F_0F_1复合物)	核糖体
核苷二磷酸激酶		运输蛋白	转移RNA
孔蛋白		醌	
磷脂:蛋白质=0.9:1		磷脂:蛋白质=0.3:0.7	
心磷脂:磷脂=0.03:0.97		心磷脂:磷脂=0.22:0.78	

外膜　线粒体最外的一层全封闭的单位膜结构，是线粒体的界膜，厚6～7nm，平整光滑。构成外膜的脂与蛋白（酶）的含量几乎相等。

外膜含有孔蛋白，当孔蛋白通道打开时最大可允许5 000道尔顿的分子通过，由于ATP、NAD、辅酶A等的分子质量都小于1 000道尔顿，所以这些分子都能自由通过外膜。由于外膜的通透性非常高，使得膜间间隙中的环境几乎与胞质溶胶相似。

外膜含有一些特殊的酶类，如参与色氨酸降解、脂肪酸链延伸的酶，表明外膜不仅参与膜磷脂的合成，同时对那些将在线粒体基质中进行彻底氧化的物质先行初步分解。外膜上含有单胺氧化酶（monoamine oxidase），该酶是外膜的标志酶，这种酶能够终止胺神经递质（如降肾上腺素和多巴胺）的作用。

内膜　位于外膜的内侧包裹线粒体基质的一层单位膜结构，厚5～6nm。由于内膜要建立H^+的质子梯度，驱动ATP的合成，所以内膜的通透性较低，一般不允许离子和大多数带电的小分子通过，为线粒体行使正常的功能提供了保证。相对于外膜而言，内膜对于大多数核苷、糖以及小的离子都是不通透的。这些物质的运输要借助于膜上的一些载体蛋白。

内膜的蛋白与脂的比例相当高，并且含有大量的心磷脂（cardiolipin），约占磷脂含量的20%，心磷脂与离子的不可渗透性有关。

线粒体内膜通常要向基质折褶形成嵴，嵴的形成使内膜的表面积大大增加。嵴有两种排列方式：一是层状（lamellar），另一是管状（tubular）。在高等动物细胞中主要是层状的排列，多数垂直于线粒体长轴。在原生动物和植物中常见的是管状排列。线粒体嵴的数目、形态和排列在不同种的细胞中差别很大。一般说需能多的细胞，不仅线粒体多，而且线粒体嵴的数目也多。

线粒体内膜的嵴上有许多排列规则的颗粒称为线粒体基粒（elementary particle），每个基粒间相距约10nm。基粒又称偶联因子1（coupling factor 1），简称F_1，实际是ATP合酶

(ATP synthase)，又叫 F_0F_1-ATP 酶复合体，是一个多组分的复合物。

内膜的酶类比外膜复杂得多，可以粗略地分为 3 类：①运输酶类：内膜上有许多运输酶类进行各种代谢产物和中间产物的运输。此外，内膜上还有一些特殊的运载体，运输磷酸和钙离子以及核苷酸、谷氨酸、鸟氨酸等。②合成酶类：内膜上还能进行一些重要的生物合成，内膜是线粒体 DNA、RNA 和蛋白质合成的场所。③电子传递和 ATP 合成的酶类：这是线粒体内膜的主要成分，参与电子传递和 ATP 的合成。

内膜的标志酶是细胞色素氧化酶。

内膜是线粒体进行电子传递和氧化磷酸化的主要部位，在电子传递和氧化磷酸化过程中，线粒体将氧化过程中释放出来的能量转变成 ATP。

膜间间隙　线粒体内膜和外膜之间的间隙，宽 6～8nm，其中充满无定形的液体，含有可溶性的酶、底物和辅助因子。由于外膜通透性很强，而内膜的通透性又很低，所以膜间间隙中的化学成分很多，几乎接近胞质溶胶。膜间间隙中也有一些酶类，如腺苷酸激酶（adenylate kinase）、二磷酸核苷激酶等，其中腺苷酸激酶是膜间间隙的标志酶，它的功能是催化 ATP 分子的末端磷酸基团转移到 AMP，生成两分子 ADP。

线粒体基质　内膜和嵴包围着的线粒体内部空间是线粒体基质。基质中的酶类最多，与三羧酸循环、脂肪酸氧化、氨基酸降解等有关的酶都存在于基质之中。其中有些酶系组成网状结构，与内膜内侧有一定的连接，这样有利于这些酶促反应所形成的 NADH 转移到内膜的电子传递链上。此外还含有 DNA、tRNA、rRNA 以及线粒体基因表达的各种酶和核糖体。

表 7-2　线粒体各部分的功能

部位	功能
外膜	磷脂的合成；脂肪酸链去饱和；脂肪酸链延伸
内膜	电子传递；氧化磷酸化；代谢物质运输
膜间间隙	核苷的磷酸化
基质	丙酮酸氧化；TCA 循环；脂肪的 β 氧化；DNA 复制；RNA 合成；蛋白质合成

基质中的标志酶是苹果酸脱氢酶。

由于线粒体各部分结构的化学组成和性质的不同，它们的功能各异（表 7-2）。

7.2.4　线粒体内膜的主动运输系统

由于线粒体对于大多数亲水物质的透性极低，所以它必须具备特殊的主动运输系统，进行下列的运输：①糖酵解产生的 NADH 必须进入电子传递链参与有氧氧化；②线粒体产生的代谢物质如草酰辅酶 A 和乙酰辅酶 A 必须运输到细胞质中，它们分别是细胞质中合成葡萄糖和脂肪酸的前体物质；③线粒体产生的 ATP 必须进入到胞质溶胶，以便供给细胞反应所需的能量，同时，ATP 水解形成的 ADP 和 P_i 又要被运入线粒体作为氧化磷酸化的底物。

水、CO_2、O_2 以及胺等能够自由通过线粒体内膜，其他线粒体所需的物质和分子以及代谢物一般不能自由穿过线粒体内膜，必须通过特殊的运输蛋白。除此之外，线粒体也是细胞内的 Ca^{2+} 库，具有储存 Ca^{2+} 的能力，而 Ca^{2+} 也不能自由进出线粒体内膜，同样要经过运输蛋白才能输入或输出线粒体。

7.2.4.1 内膜的运输系统

在线粒体内膜上具有完善的运输系统，主要是运输蛋白和一些起促进运输作用的脂类（如心磷脂）。运输系统也包括参与电子传递和氢质子传递的复合物，通过它们的作用，在膜间间隙和基质之间建立 pH 梯度和质子梯度，这种梯度的建立有助于驱动运输蛋白的运输作用。内膜上有运输丙酮酸、脂肪酸和特殊氨基酸的运输蛋白，其中某些运输蛋白（包括同向和逆向运输蛋白）的运输作用是靠质子梯度驱动的（图 7-8）。

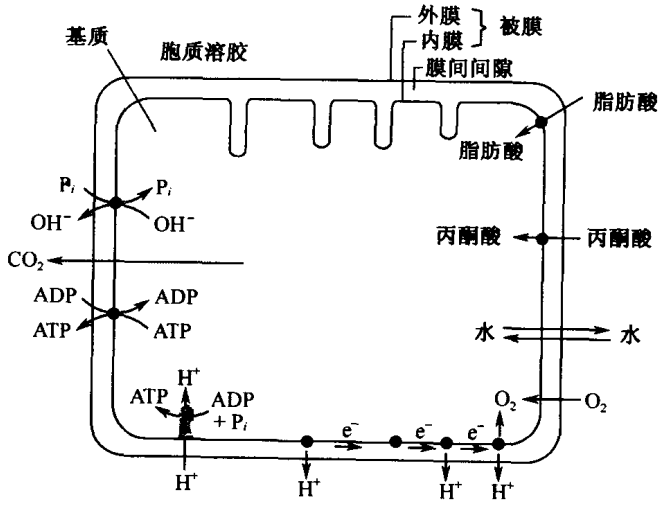


图 7-8 线粒体内膜中的运输系统（引自 Alberts *et al*., 1998）

线粒体氧化磷酸化作用所需无机磷（P_i）输入是与线粒体中 OH^- 的输出同时逆向进行的（二者间输入与输出的比值为 1:1）。

线粒体中由 ADP + P_i 生成的 ATP 向细胞质的运送是通过另一种运输蛋白与细胞质中的 ADP 进行交换完成的，其结果，ATP 被运输到胞质溶胶供细胞代谢需要，ADP 被运进线粒体基质，与运进的 P_i 一起参与 ATP 的合成。这两种逆向运输泵共同维持线粒体基质中高 ADP 和 P_i 的浓度。

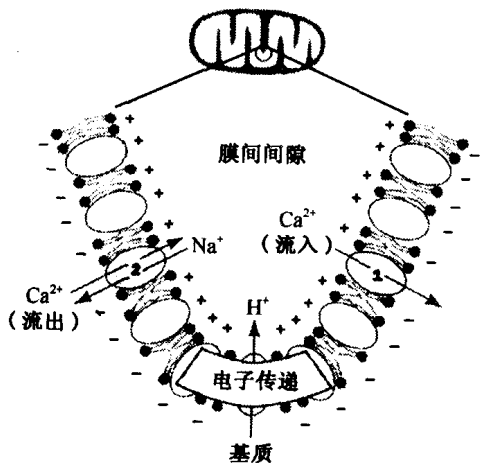


图 7-9 线粒体的两种 Ca^{2+} 运输系统（引自 Voet *et al*., 1995）

系统 1 是由膜动力势引起的 Ca^{2+} 流向线粒体基质；系统 2 是通过与 Na^+ 的交换将 Ca^{2+} 输出到胞质溶胶。

7.2.4.2 线粒体对细胞内 Ca^{2+} 的调节

线粒体、内质网和细胞外基质都是 Ca^{2+} 的储藏地，在内质网、肌质网和细胞质膜上都有 Ca^{2+} 泵的存在。线粒体内膜上有两种类型的 Ca^{2+} 运输系统，能够将 Ca^{2+} 输入到线粒体基质中，或将 Ca^{2+} 从线粒体基质运输到膜间间隙（图 7-9）。

Ca^{2+} 从线粒体膜间间隙输入到线粒体基质是

由内膜上的动力势驱动的（内膜内侧带负电，能吸引正电离子）。Ca^{2+}输入的速率随着外部Ca^{2+}浓度的变化而变化。在心脏、脑和骨骼肌等组织中，Ca^{2+}的输出是由Na^{+}梯度驱动的。线粒体基质中的Ca^{2+}可与Na^{+}逆向交换，在正常情况下，这种交换运输的速度非常之快。因此，线粒体、内质网和肌质网都能作为细胞质中Ca^{2+}调节的缓冲区域。如果胞质溶胶中Ca^{2+}浓度升高，Ca^{2+}输入线粒体的速率提高，而Ca^{2+}输出的速率维持不变，这样导致线粒体基质Ca^{2+}浓度的升高而胞质溶胶中Ca^{2+}浓度下降到原始的浓度水平。反之，胞质溶胶中Ca^{2+}浓度的下降，促使线粒体对Ca^{2+}输入速率的下降，而只有线粒体Ca^{2+}的输出速率不变，最后导致胞质溶胶中Ca^{2+}浓度恢复到一个调节点（set-point）。

7.3 导向信号与线粒体蛋白定位

线粒体本身的遗传信息有限，由线粒体DNA编码的蛋白质大约只有13种，而线粒体执行功能（包括结构）时，需要上百种蛋白质，其中绝大多数都是核基因编码，在细胞质的游离核糖体上合成后运输到线粒体的（表7-3）。细胞质中合成的蛋白是如何运进线粒体并准确定位呢？

表7-3 细胞质中合成的某些线粒体蛋白质

线粒体定位	蛋白质
线粒体基质	F_1-ATPase：α亚基（植物除外），β，γ亚基和δ亚基（某些真菌）RNA聚合酶、DNA聚合酶、核糖体蛋白、柠檬酸合成酶、TCA酶系、乙醇脱氢酶（酵母）、鸟氨酸氨基转移酶（哺乳动物）
内膜	ADP-ATP逆向运输蛋白、磷酸-OH^-逆向运输蛋白、细胞色素*c*氧化酶亚基4，5，6，7、F_0-ATPase的蛋白质、$CoQH_2$-细胞色素*c*还原酶复合物亚基1，2，5（Fe-S），6，7，8
膜间间隙	细胞色素*c*、细胞色素*c*过氧化物酶、细胞色素b_2、$CoQH_2$-细胞色素*c*还原酶复合物亚基4（细胞色素c_1）
外膜	孔蛋白

7.3.1 蛋白质寻靶与分选

真核生物的细胞是高度有序的结构，蛋白质是各种结构的主要成分，而蛋白质又是在核糖体上合成的，因此，核糖体合成的蛋白质必须通过一定的机制定位到相应的细胞器或功能部位。

7.3.1.1 蛋白质的两种转运方式

细胞质中的核糖体在合成蛋白质时有两种可能的存在状态，一种是在蛋白质合成的全过程一直保持游离状态（实际上是与细胞骨架结合在一起的），这种核糖体称为游离核糖体（free ribosome）；另一种情况是核糖体在合成蛋白质的初始阶段处于自由状态，但是随着肽链的合成，核糖体被引导到内质网上与内质网结合在一起，这种核糖体称为膜结合核糖体（membrane-bound ribosome）。这两种核糖体上合成的蛋白质不仅在细胞内的去向不同，它们的转运方式也是不同的。

翻译后转运（post-translational translocation） 由于游离核糖体上合成的蛋白质必须等

蛋白质完全合成并释放到胞质溶胶后才能被转运，所以将这种转运方式称为翻译后转运。游离核糖体合成的蛋白质在细胞内的定位，由前体蛋白本身具有的导向信号决定。不同类型的导向信号可以引导蛋白质定位到特定的细胞器，如线粒体、叶绿体、细胞核和过氧化物酶体等（图 7-10），由于在游离核糖体上合成的蛋白质在合成释放之后需要自己寻找目的地，因此又称为蛋白质寻靶（protein targeting）。

共翻译转运（co-translational translocation）　膜结合核糖体上合成的蛋白质，在它们进行翻译的同时就开始了转运，主要是通过定位信号，一边翻译，一边进入内质网，然后再进行进一步的加工和转移。由于这种转运定位是在蛋白质翻译的同时进行的，故称为共翻译转运（图 7-11）。在膜结合核糖体上合成的蛋白质通过信号肽，经过连续的膜系统转运分选才能到达最终的目的地，这一过程又称为蛋白质分选（protein sorting），或蛋白质运输（protein trafficking），将在第 9 章中详细讨论。

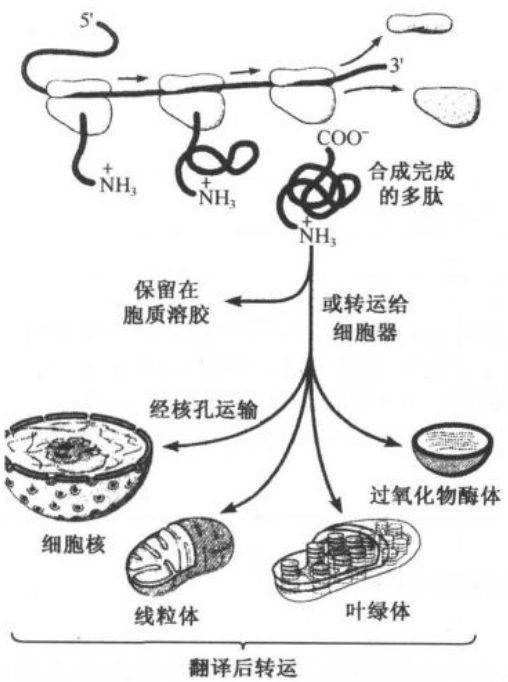


图 7-10　蛋白质翻译后转运
（引自 Becker *et al*., 1996）
定位在线粒体、叶绿体、细胞核、细胞质、过氧化物酶体的蛋白质在游离核糖体上合成后释放到胞质溶胶中，进入细胞核的蛋白质通过核孔运输，与定位到其他翻译后转运的细胞器蛋白的运输机制不同。

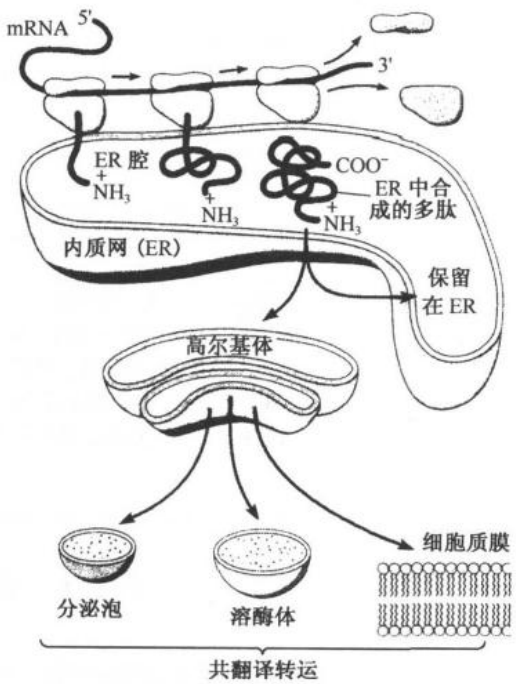


图 7-11　蛋白质的共翻译转运
（引自 Becker *et al*., 1996）
膜结合核糖体合成的蛋白质经内质网、高尔基体进行转运，运输的目的地包括内质网、高尔基体、溶酶体、细胞质膜、细胞外基质等。

7.3.1.2　导向序列与信号序列

无论是在游离核糖体合成的蛋白质还是在膜结合核糖体合成的蛋白质，它们的转运都是由信号引导的，这种信号一般存在于蛋白质的 N 端，这就是蛋白质的定位信号，而定位信号也是基因中的编码序列。由于游离核糖体合成的蛋白质与膜结合核糖体合成的蛋白质的信号

序列不同导致运输机制的不同，为了便于区别它们，将游离核糖体上合成的蛋白质的 N 端的信号统称为导向信号（targeting signal），或导向序列（targeting sequence）。由于这一段序列是氨基酸组成的肽，所以又称为转运肽（transit peptide），或前导肽（leading peptide）。将膜结合核糖体上合成的蛋白质的 N 端具有信号作用的序列称为信号序列（signal sequence），将组成该序列的肽称为信号肽（signal peptide）。在不需要特别区分时，可将它们统称为信号序列或信号肽。

7.3.1.3 线粒体转运肽（前导肽）的一般特性

线粒体转运肽是新生蛋白 N 端一段大约 20～80 个氨基酸残基的肽链，通常带正电荷的碱性氨基酸（特别是精氨酸和赖氨酸）含量较为丰富，如果它们被不带电荷的氨基酸取代就不起引导作用，说明这些氨基酸对于蛋白质的定位具有重要作用。这些氨基酸分散于不带电荷的氨基酸序列之间。转运肽序列中不含有或基本不含有带负电荷的酸性氨基酸，并且有形成两性 α 螺旋的倾向。转运肽的这种特征性的结构有利于穿过线粒体的双层膜。不同的转运肽之间没有同源性，说明转运肽的序列与识别的特异性有关，而与二级或高级结构无太大关系。

线粒体转运肽转运蛋白质时，具有以下特点。

（1）需要受体。由于被转运的蛋白需要穿过（或插入）线粒体膜，转运肽首先需要与线粒体膜上的受体识别，然后才能进行转运。

（2）从接触点进入。线粒体的内外膜要局部融合形成被运输蛋白进入的接触点（contact site）。

（3）蛋白质要解折叠。蛋白质在合成时为了防止降解，需要立即折叠形成空间结构，但是在转运时，必须解折叠，运入线粒体之后再重新折叠，

（4）需要能量。转运肽引导的蛋白质转运是一个耗能过程，既要消耗 ATP，又要膜电位的驱动。

（5）需要转运肽酶。由于转运肽只是起蛋白质转运的引导作用，而非蛋白质的永久结构，所以，当蛋白质到达目的地后，转运肽要被切除，是由转运肽酶（transit peptidase）催化的。

（6）需要分子伴侣的帮助。在线粒体蛋白的转运过程中，至少需要两种类型的分子伴侣的参与，一种是帮助转运的蛋白质解折叠，另一种是将转运的蛋白质重新折叠。

7.3.2 线粒体蛋白转运

构成线粒体的蛋白主要是核基因编码的，少量是线粒体基因编码的，无论是核基因还是线粒体基因编码的蛋白质都要转运定位。因为线粒体有 4 个组成部分，其中有两层膜，所以转运到线粒体基质的由细胞质核糖体合成的蛋白质必须穿过两层膜障碍（图 7-12）。

7.3.2.1 线粒体基质蛋白转运

线粒体基质蛋白（mitochondrial matrix protein），除极少数外，都是在细胞质游离核糖体上合成，并通过转运肽转运进来的，转运过程十分复杂（图 7-13）。

运输过程是：前体蛋白在游离核糖体合成释放之后，在细胞质分子伴侣 Hsp70 的帮助下

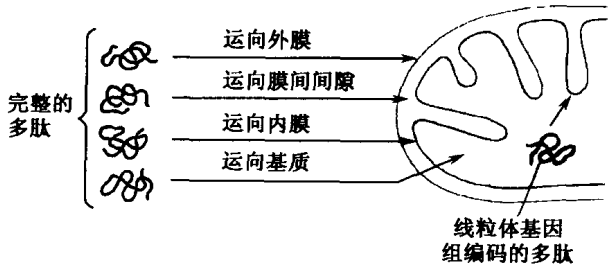


图 7-12　线粒体蛋白转运的部位（引自 Becker *et al*., 1996）

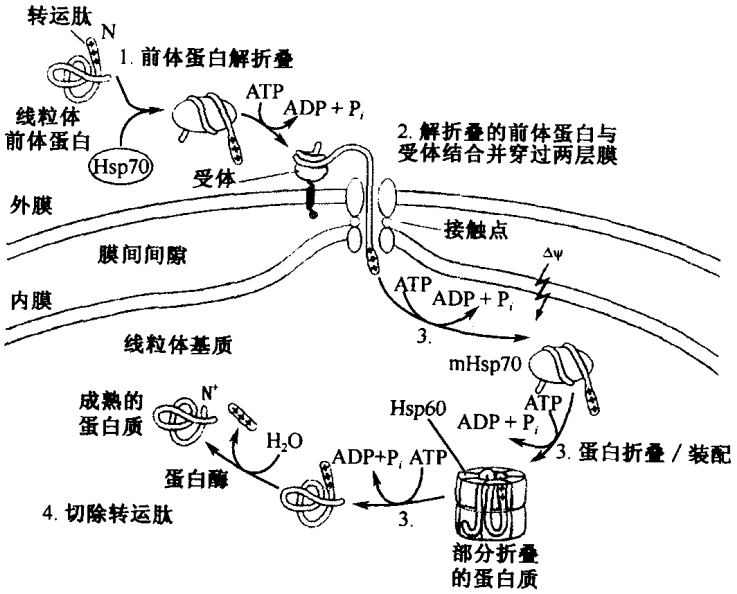


图 7-13　蛋白质输入线粒体基质（引自 Karp, 1996）

解折叠，然后通过 N 端的转运肽同线粒体外膜上的受体蛋白识别，并在受体（或附近）的内外膜接触点处利用 ATP 水解产生的能量驱动前体蛋白进入转运蛋白（translocator）的运输通道，然后由电化学梯度驱动穿过内膜，进入线粒体基质。在基质中，由 mHsp70 继续维持前体蛋白的解折叠状态。然后在 Hsp60 的帮助下，前体蛋白进行正确折叠，最后由转运肽酶切除转运肽，成为成熟的线粒体基质蛋白。

7.3.2.2　线粒体膜间间隙蛋白的转运

线粒体膜间间隙蛋白，如细胞色素 b_2 的定位需要两个导向序列，位于 N 端最前面的为基质导向序列（matrix-targeting sequence），其后还有第二个导向序列，即膜间间隙导向序列（intermembrane-space-targeting sequence），功能是将蛋白质定位于内膜或膜间间隙，这类蛋白质有两种转运定位方式。

（1）*保护性寻靶*（conservative targeting）　前体蛋白在 N 端的基质导向序列引导下采用与线粒体基质蛋白同样的运输方式，将前体蛋白转运到线粒体基质，在基质中由转运肽酶切除基质导向序列后，膜间间隙导向序列就成了 N 端的导向序列，它能够识别内膜的受体和

转运蛋白，引导蛋白质穿过内膜，进入线粒体膜间间隙，然后由线粒体膜间间隙中的转运肽酶将膜间间隙导向序列切除（图 7-14）。

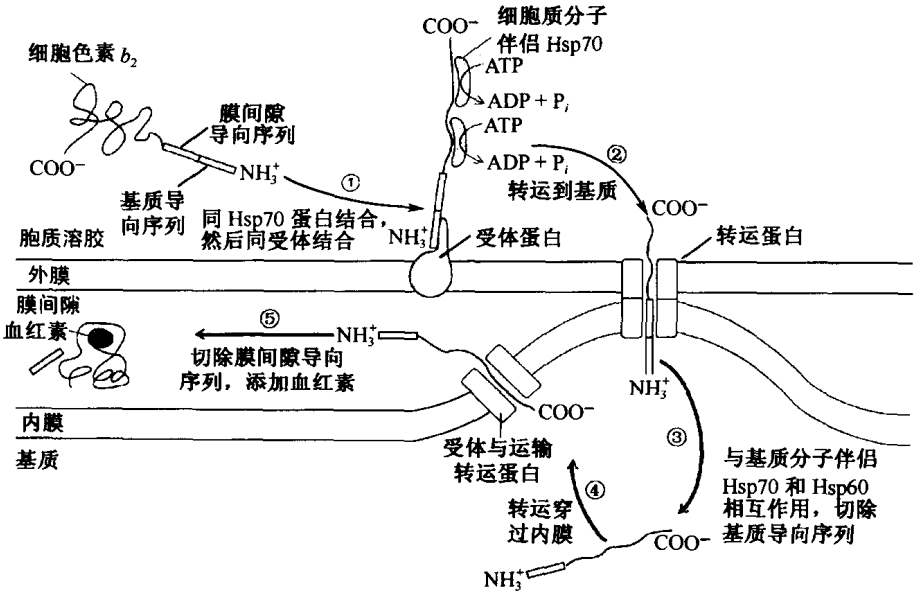


图 7-14　线粒体膜间间隙蛋白的保护性寻靶（引自 Lodish *et al*., 1999）

（2）非保护性寻靶（nonconservative targeting）　与保护性寻靶不同，蛋白质的非保护性寻靶首先在线粒体基质导向序列的引导下，通过线粒体的外膜和内膜，但是疏水的膜间间隙导向序列作为停止转运序列（stop-transfer sequence）锚定在内膜上，从而阻止了蛋白质的 C 端穿过内膜进入线粒体基质，然后通过蛋白质的扩散作用，锚定在内膜上的蛋白质逐渐离开转运蛋白，最后在转运肽酶的作用下，将膜间间隙导向序列切除，蛋白质释放到膜间间隙，结合血红素后，蛋白质折叠成正确的构型（图 7-15）。

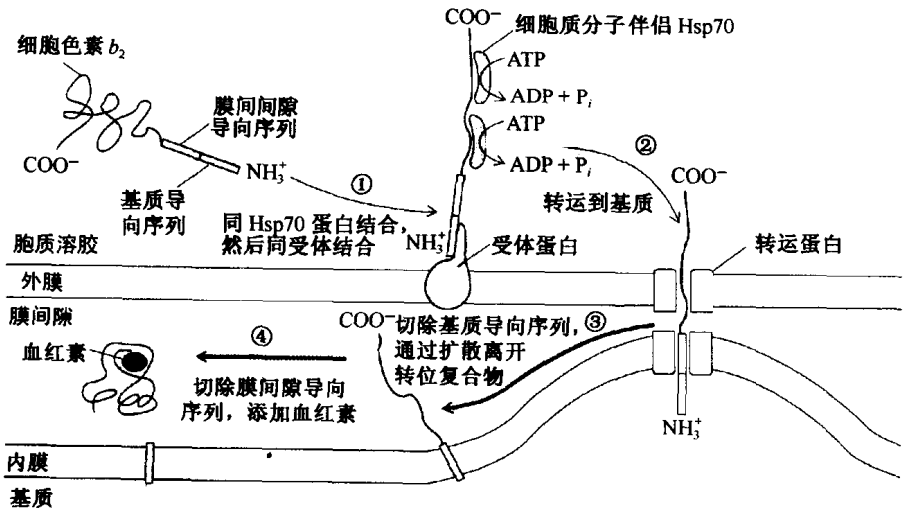


图 7-15　线粒体膜间间隙蛋白的非保护性寻靶（引自 Lodish *et al*., 1999）

7.3.2.3 线粒体内膜和外膜蛋白的转运

线粒体外膜和内膜蛋白的定位只需要一个引导肽，引导外膜和内膜蛋白穿膜，至于这些蛋白质如何结合在相应的膜上，则是靠引导肽后面的一段疏水的停止转运序列（hydrophobic stop-transfer sequence）阻止了蛋白质进一步穿膜，从而被结合在线粒体的膜上。如果疏水的停止转运序列同外膜转运酶（translocase of the outer membrane, Tom）结合，则成为外膜蛋白，若是同内膜转运酶（translocase of the inter membrane, Tim）结合则是内膜蛋白（图7-16）。

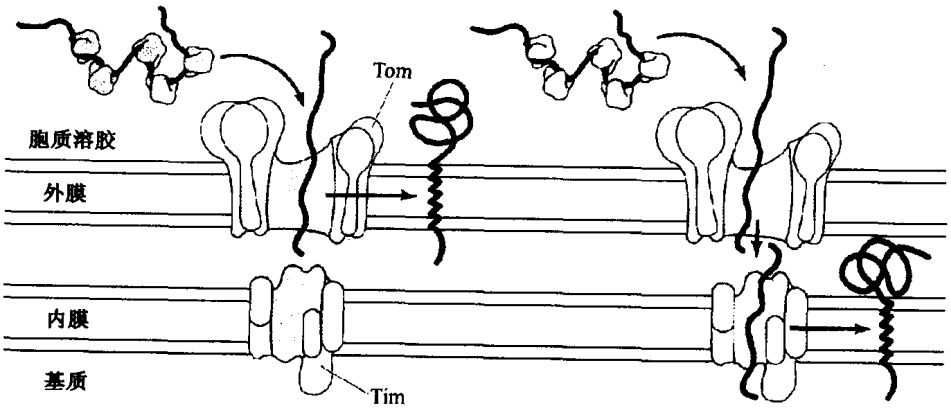


图 7-16 线粒体外膜和内膜蛋白的定位（引自 Cooper, 2000）

通过体外实验证明疏水性氨基酸序列在膜蛋白定位中的作用。P70 是线粒体外膜的一个重要的蛋白质，在 P70 的 N 端有一个短的基质导向序列，紧随其后是一段较长的、强疏水性氨基酸序列，实验中，如果将疏水性氨基酸序列缺失，P70 进入线粒体基质，并且其基质导向序列依然连接在一起。这一结果提示，长的疏水性氨基酸序列可作为停止转运信号，既防止了外膜蛋白进入线粒体基质，又作为锚定序列将外膜蛋白锚定在外膜上。正常情况下，外膜蛋白 N 端的基质导向序列和长的疏水性序列都不会被切除。

7.3.3 线粒体蛋白转运的实验研究

上面所讨论的线粒体蛋白的转运方式已得到许多实验的支持。

7.3.3.1 线粒体蛋白转运的实验证明

通过脉冲示踪研究发现酵母线粒体蛋白合成之后存在于胞质溶胶中，后来逐渐进入线粒体各部位，通过无细胞系统进一步证明这一结果（图 7-17）。

首先在无细胞系统中合成酵母线粒体蛋白，然后将合成的蛋白质分成两组，一组直接加入胰蛋白酶，另一组先加入线粒体，然后再用胰蛋白酶处理，发现加入线粒体的一组中的蛋白质对胰蛋白酶具有抗性，而不加线粒体的一组中蛋白质被胰蛋白酶水解。由于胰蛋白酶是水溶性的酶，不能进入线粒体，所以对胰蛋白酶的抗性说明线粒体蛋白进入了线粒体从而得到保护。

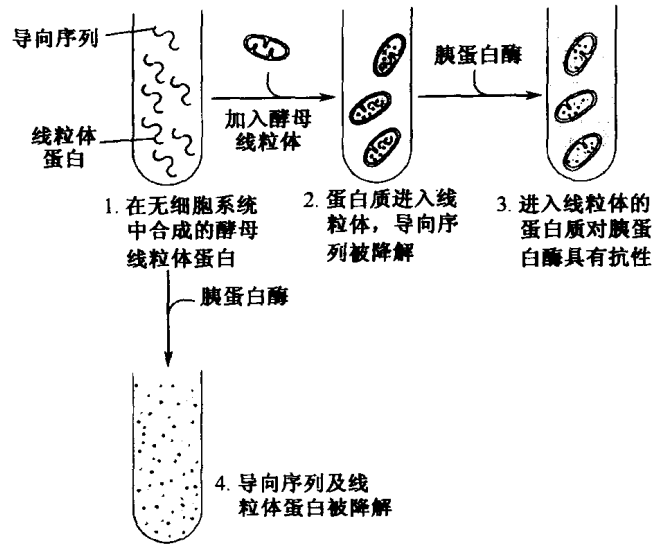


图 7-17　线粒体蛋白前体转运的实验证明（引自 Lodish *et al*., 1999）

7.3.3.2　转运中间体与导向序列的特异性研究

在线粒体蛋白转运中一个很重要的中间过程是基质导向序列穿过内外膜，如果能够观察到该中间体的存在则是对上述转运机制的最有力的证明。另外，线粒体导向序列对所引导的

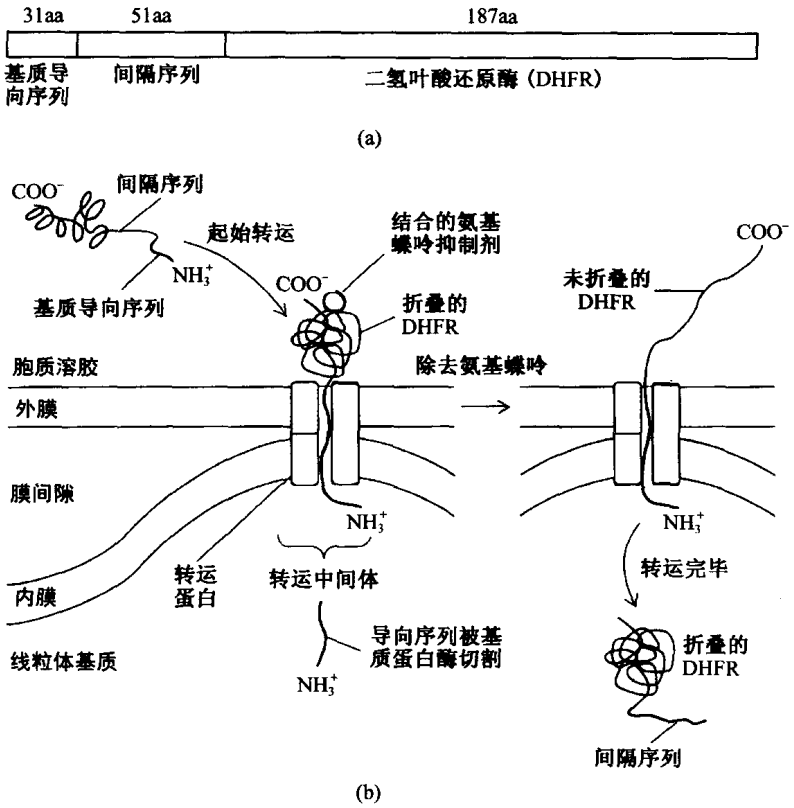


图 7-18　线粒体蛋白转运中间体的证明（引自 Lodish *et al*., 1995）

（a）通过重组 DNA 技术构建的嵌合蛋白的结构；（b）转运中间体的证明。

蛋白质是否具特异性也是人们所关心的问题。通过体外实验证实了穿膜中间体的存在，同时证明导向序列对所引导的蛋白质没有特异性（图 7-18）。

首先利用 DNA 重组技术构建一个嵌合蛋白：N 端含有一个长为 31 个氨基酸的线粒体基质导向序列，其后接上一段间隔序列，长度为 51 个氨基酸，紧接着是 187 个氨基酸组成的小鼠二氢叶酸还原酶（DHFR），该酶在正常情况下存在于胞质溶胶中。用无细胞系统合成的 DHFR 嵌合蛋白能够被转运到线粒体基质，然后切除导向序列。氨甲蝶呤（methotrexate）是 DHFR 抑制剂，它能够与嵌合的 DHFR 的活性位点牢牢地结合，使嵌合 DHFR 锁定在折叠状态而不能进入线粒体基质。但是 N 端的导向序列能够进入线粒体基质，并被水解，此时的 DHFR 仍然被结合在膜上形成稳定的转运中间体。这一实验中，间隔序列的设计非常重要，如果间隔序列较短，譬如说 35 个氨基酸，就得不到稳定的转运中间体。当除去氨甲蝶呤，嵌合 DHFR 就能完全进入线粒体基质。这一实验同时证明了转运肽没有特异性。

7.4 线粒体的功能——氧化磷酸化作用

线粒体是真核生物氧化代谢的部位，是糖、脂肪和氨基酸最终氧化放能的场所。最终氧化的共同途径是三羧酸循环和呼吸链的氧化磷酸化。

7.4.1 真核细胞中的氧化作用（oxidation）

葡萄糖和脂肪酸是真核细胞能量的主要来源，细胞通过对葡萄糖的代谢获取能量。葡萄

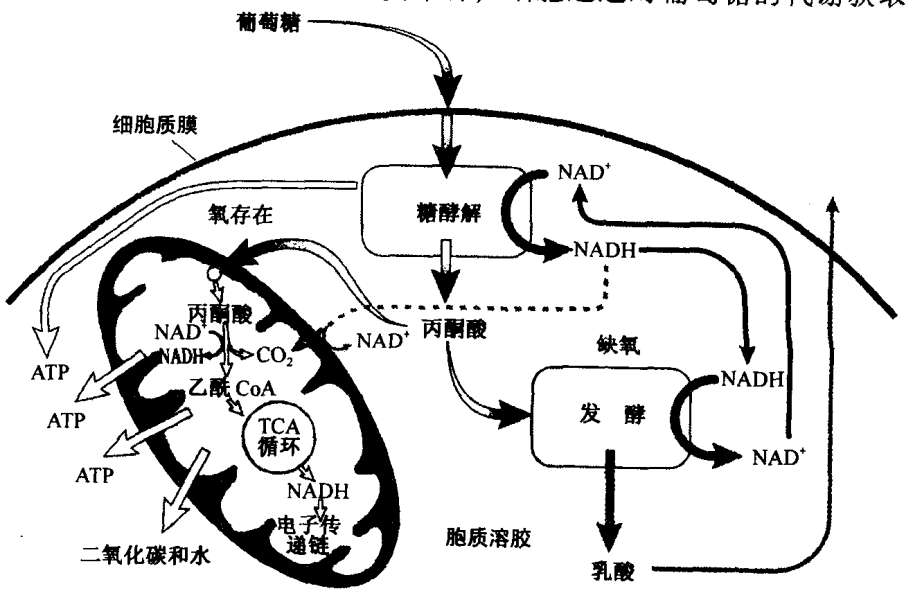


图 7-19 真核细胞中糖类代谢全览（引自 Karp, 1996）

在胞质溶胶中，糖酵解产生丙酮酸和 NADH，如果缺氧，丙酮酸被 NADH 还原成乳酸（或发酵的其他产物，如在酵母中产生乙醇）。反应中形成的 NAD^+ 被糖酵解重新利用。如果有 O_2 的存在，丙酮酸在膜运输蛋白的帮助下进入线粒体基质，在基质中脱羧，并同辅酶 A（CoA）连接，产生 NADH 和乙酰 CoA。在糖酵解过程中产生的 NADH，将它的高能电子提供给线粒体内膜的化合物。乙酰 CoA 通过 TCA 循环，产生 NADH 和 $FADH_2$，这些分子中的电子通过内膜中的电子传递链，最终传递给分子氧（O_2）。在电子传递过程中释放的能量被用于 ATP 的合成，如果将在电子传递过程中释放的所有能量都用于 ATP 合成，1 分子葡萄糖能够产生 36 个 ATP 分子。

糖进入细胞后先在细胞质中通过酵解作用生成丙酮酸，如果有氧存在，丙酮酸进入线粒体基质经过三羧酸循环、电子传递和氧化磷酸化，最后生成 ATP 和水。如果没有氧，丙酮酸经过发酵生成乳酸（图 7-19）。

葡萄糖（或糖原）在正常有氧的条件下，氧化后，产生 CO_2 和水，这个总过程称做糖的有氧氧化，又称细胞氧化或生物氧化。整个过程分为 3 个阶段：①糖氧化成丙酮酸。葡萄糖进入细胞后经过一系列酶的催化反应，最后生成丙酮酸的过程，此过程在细胞质中进行，并且是不耗能的过程；②丙酮酸进入线粒体，在基质中脱羧生成乙酰 CoA；③乙酰 CoA 进入三羧酸循环，彻底氧化。

7.4.1.1 葡萄糖酵解生成丙酮酸

细胞质中的葡萄糖（或糖原）在一系列酶的催化下生成丙酮酸的过程称为糖酵解（glycolysis）。反应的主要过程包括：①葡萄糖在磷酸化酶的作用下形成 1，6 -二磷酸果糖，此过程需要消耗两个 ATP；②二磷酸 6 -碳糖被裂解生成两个 3 -碳糖；③三碳糖被逐步转变成丙酮酸（图 7-20）。

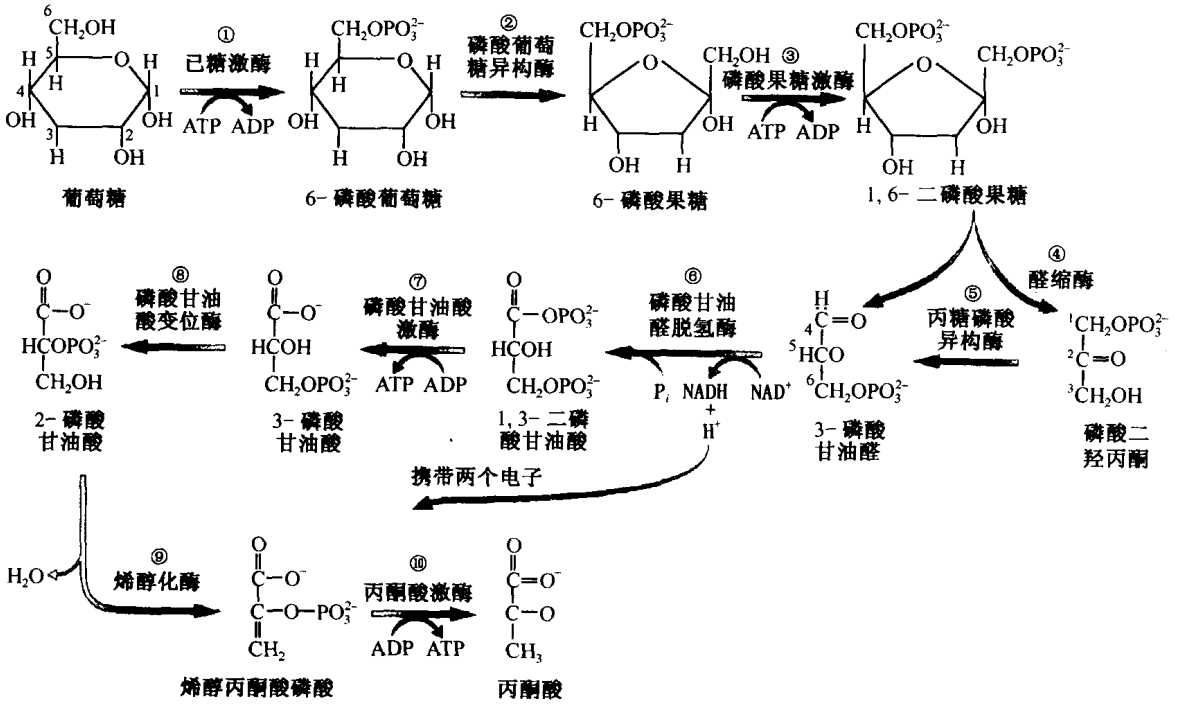


图 7-20 葡萄糖经糖酵解生成丙酮酸的过程（引自 Karp，1996）

7.4.1.2 乙酰 CoA 的生成及作用

细胞质中由糖酵解生成的丙酮酸分子经过线粒体外膜的孔蛋白进入线粒体膜间间隙，然后在运输蛋白的作用下穿过内膜进入线粒体基质。在基质中，丙酮酸被丙酮酸脱氢酶（pyruvate dehydrogenase）氧化成乙酰辅酶 A。丙酮酸脱氢酶是一种多蛋白的复合物，含有 3 种酶、

5 个辅酶、两个调节蛋白。这些成分共同作用将丙酮酸氧化生成乙酰辅酶 A。反应中发生 3 个事件：①NAD^+ 还原成 NADH；②丙酮酸分子中的一个碳被转变成 CO_2 释放出来；③丙酮酸中剩下的二碳乙酰基团连接到辅酶 A（CoA），生成乙酰辅酶 A。

生物需要能量时首先利用多糖，必要时也会利用脂肪。脂肪被水解生成脂肪酸，脂肪酸能够进入线粒体基质，在基质中通过 β 氧化途径（β-oxidation pathway）循环氧化生成乙酰辅酶 A。在此过程中，除了每两个脂肪酸碳产生一分子乙酰辅酶 A 之外，还产生一分子 NADH、一分子 $FADH_2$（图 7-21）。乙酰辅酶 A 是线粒体能量代谢的核心分子，无论是糖还是脂肪酸作为能源，都要在线粒体中被转变成乙酰辅酶 A 才能进入三羧酸循环彻底氧化。

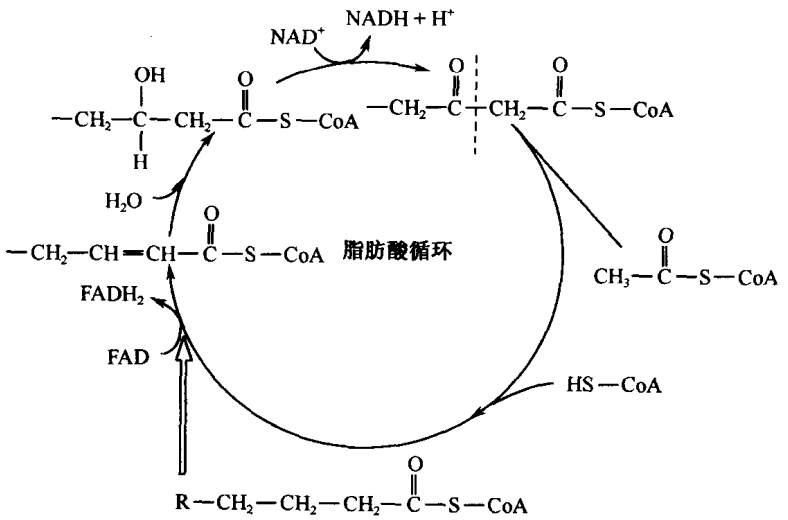


图 7-21　脂肪酸氧化

脂肪酸氧化的第一步是与辅酶 A 的巯基（—SH）结合而被激活。这一反应发生在脂肪酸的脂酰基团在线粒体内膜运输蛋白帮助下穿过内膜之后。在线粒体中，脂酰 CoA 经过 β 氧化循环，每循环 1 次，脱去 2 个 C，产生 1 分子乙酰 CoA 进入 TCA 循环，同时产生 1 分子 NADH、1 分子 $FADH_2$。

7.4.1.3　三羧酸循环

乙酰 CoA 一旦形成，立即进入线粒体基质的循环氧化途径，即三羧酸循环（tricarboxylic acid cycle，TCA cycle），又称 Krebs 循环、柠檬酸循环（图 7-22）。参与 TCA 循环的酶有很多种，除琥珀酸脱氢酶是结合在内膜上以外，其他的酶都存在于线粒体基质。循环开始，由乙酰 CoA 和草酰乙酸缩合成有 3 个羧基的柠檬酸，柠檬酸经一系列反应，一再氧化脱羧，经酮戊二酸、琥珀酸，再降解成草酰乙酸。每循环一次，仅用去 1 分子乙酰基中的二碳单位，最后生成 2 分子的 CO_2、1 分子 GTP、4 分子的 NADH（连同丙酮酸脱羧形成乙酰 CoA 时产生的 1 分子 NADH 在内）和 1 分子的 $FADH_2$，总反应为：

乙酰 CoA + $2H_2O$ + FAD + 3NAD + GDP + P_i → $2CO_2$ + $FADH_2$ + 3NADH + $3H^+$ + GTP + HS − CoA。

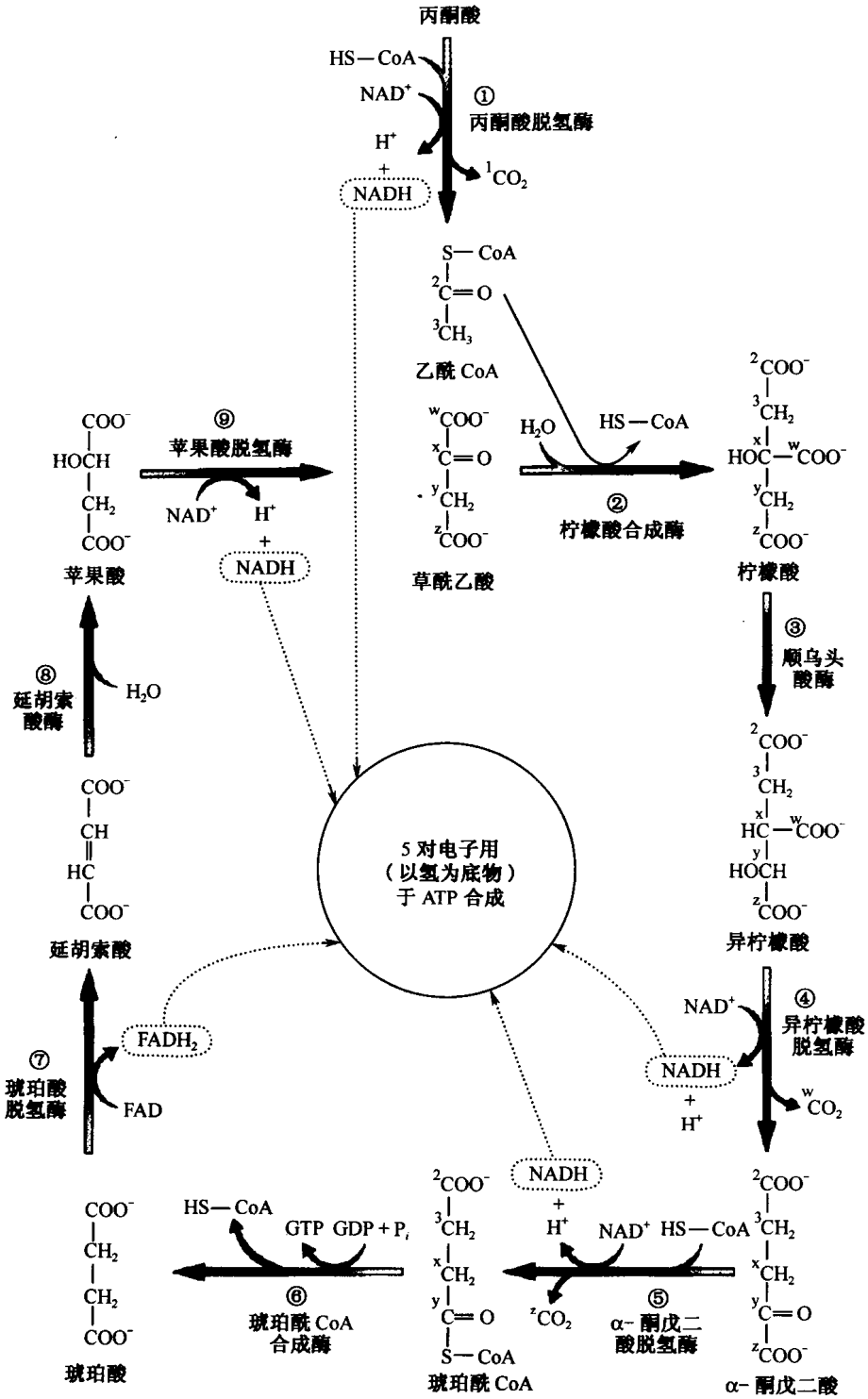


图 7-22　TCA 循环（引自 Karp, 1996）

图中特别标出从丙酮酸氧化开始释放的 5 对用于 ATP 合成的电子形成部位。

7.4.1.4 辅酶在能量传递中的作用

富含能量的糖类和脂肪能够通过氧化反应释放出能量。根据定义，释放电子是氧化，在反应中获得电子是还原，因此氧化和还原反应总是同时发生。氧化的底物释放出的电子被另一个分子接收，而接收电子的底物则被还原。因此氧化还原反应涉及电子从一种底物向另一种底物传递。在生物氧化中，电子传递常常与氢原子的传递同时进行。假定反应：$XH_2 + Y \rightarrow X + YH_2$，在这一反应中，要从底物 XH_2 中脱去两个氢原子，并转移到底物 Y，每个氢原子含有一个电子，所以转移两个氢原子就要将两个电子从底物 XH_2 转移到底物 Y。底物 XH_2 失去两个电子是氧化的结果，与此相反，底物 Y 得到两个电子，则是还原。由此看来，被氧化的底物是电子供体，被还原的底物则是电子受体。

在细胞的氧化还原反应中需要一些辅酶作为电子供体或受体，具有这种作用的辅酶是 NAD^+、$NADP^+$、FAD 和 FMN（图 7-23）。

利用 FAD 或 FMN 作为辅酶的酶称为黄素蛋白（flavoprotein），在多数情况下 FAD 或

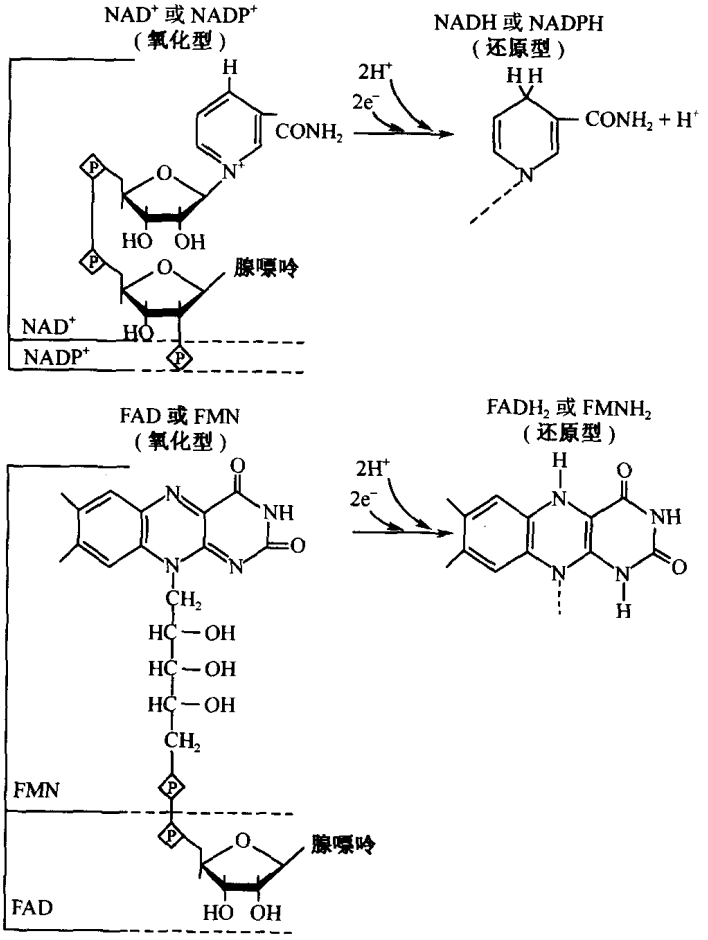


图 7-23 辅酶 NAD^+、$NADP^+$、FAD 和 FMN 在氧化和还原状态下的结构

在 NAD^+ 和 $NADP^+$ 还原期间转移一个质子和两个电子，FAD 和 FMN 还原过程中转移两个质子和两个电子。尽管它们转移的质子数量不同，但是每次转移的电子数量是相同的，都是两个电子。

FMN 是与蛋白质紧密结合在一起的。与此相反，NAD^+ 或 $NADP^+$ 只是与酶松散地结合在一起，其结果，在氧化或还原反应之后，NAD^+ 或 $NADP^+$ 能够从一种酶转移到另一种酶。除了这些差异之外，这 4 种辅酶有一个共同的特性：每一种都能从氧化的底物中接收一对电子，然后将接收的电子传递给另一种将被还原的分子。当辅酶从被氧化的分子接收电子被还原时辅酶分子的自由能增加，这就是为什么辅酶能够捕获从氧化底物释放出来的某些能量的原因。还原型的辅酶 NADH、NADPH、$FMNH_2$ 和 $FADH_2$ 都是能够向其他反应传递能量的高能分子。

TCA 循环产生的净平衡产物是 $FADH_2$ 和 NADH，它们都含有在 TCA 循环中底物氧化释放的电子，总共 5 对电子（连同丙酮酸转变成乙酰 CoA 时释放的一对电子），这些电子可用于 ATP 的合成。另外，葡萄糖在胞质溶胶中进行糖酵解时也有 NADH 的形成，但是线粒体膜不能将胞质溶胶中的 NADH 运入到线粒体参与电子传递。虽然胞质溶胶中形成的 NADH 自身不能进入线粒体，但可通过另外的方式将其电子转移到线粒体并参与电子传递：将电子还原那些小分子的代谢物，这些小分子的代谢物能够：①通过苹果酸-天冬氨酸穿梭（malate-aspartate shuttle）进入线粒体，然后将线粒体中 NAD^+ 还原成 NADH；②通过甘油-磷酸穿梭（glycerol-phosphate shuttle），将电子传递给线粒体的 FAD，使其还原形成 $FADH_2$（图 7-24）。所以，线粒体用于 ATP 合成的电子不仅有来自线粒体内部的，也有来自胞质溶胶糖酵解过程形成的 NADH。

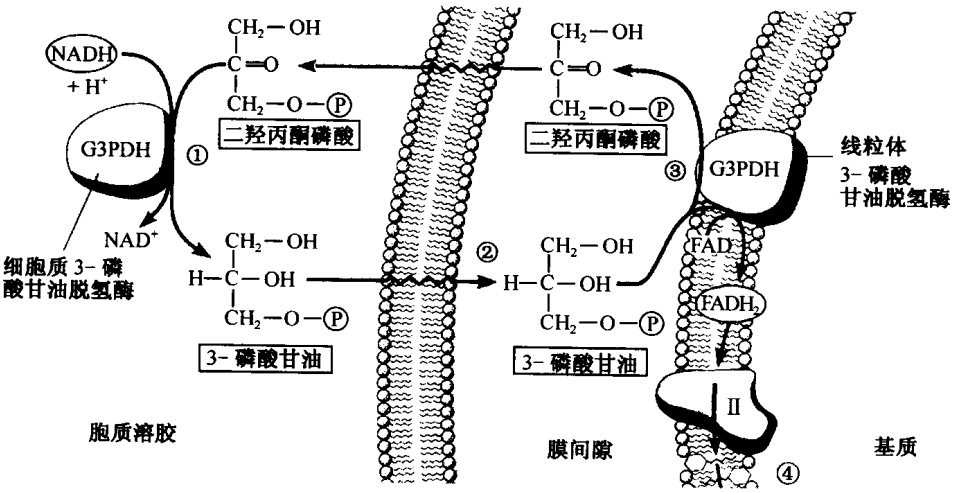


图 7-24　甘油-磷酸穿梭

在甘油-磷酸穿梭过程中，电子从 NADH 转移给二羟丙酮磷酸（DHAP）生成 3-磷酸甘油，进入线粒体膜间间隙，3-磷酸甘油被线粒体内膜中的 3-磷酸甘油脱氢酶脱氢，使内膜中 FAD 还原成 $FADH_2$。脱氢的 3-磷酸甘油又穿梭回到胞质溶胶。$FADH_2$ 中的电子再转移给线粒体内膜的电子传递链中的电子载体。

7.4.2　呼吸链与电子传递

呼吸链（respiratory chain）又称电子传递链，是线粒体内膜上一组酶的复合体。其功能

是进行电子传递、H^+的传递及氧的利用，产生 H_2O 和 ATP。

在三羧酸循环中，乙酰 CoA 中的两个碳被完全氧化生成两分子 CO_2 释放出来，直接产生的能量（ATP）又很少，此过程释放的大部分能量都储存在辅酶（NADH 和 $FADH_2$）分子中。只有将这些还原型的辅酶氧化成氧化型的辅酶，才能将能量释放出来，该过程涉及电子从 NADH 或 $FADH_2$ 传递到氧，最后生成水，氧化型的 NAD^+ 和 FAD 又可参与三羧酸循环：

$$NADH + 1/2\ O_2 \rightarrow NAD^+ + H_2O + 能量$$

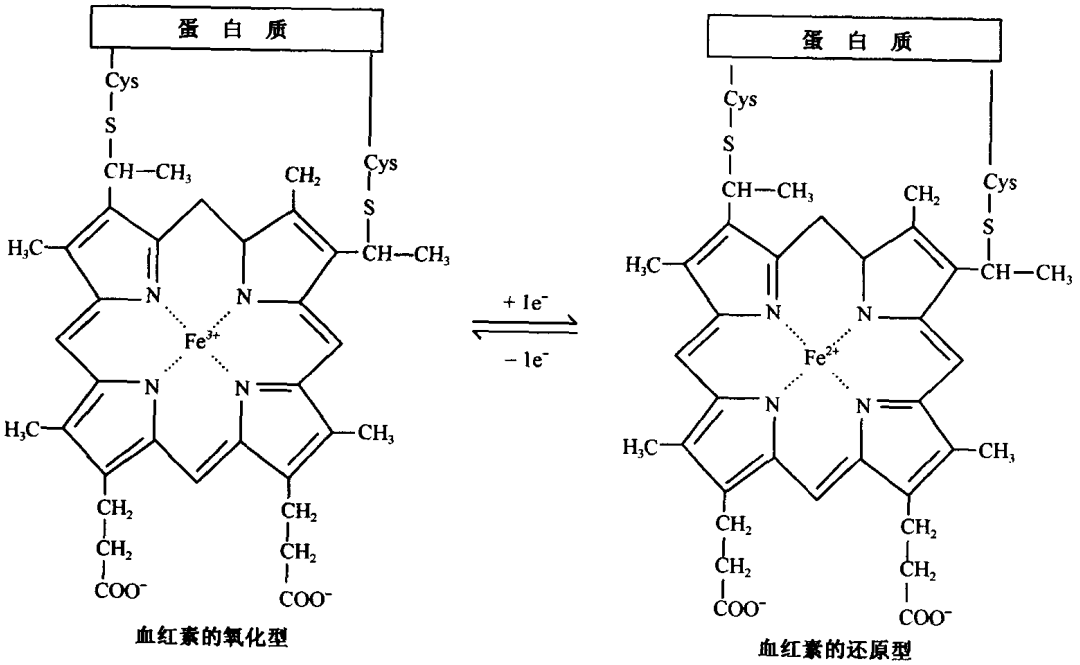
$$FADH_2 + 1/2\ O_2 \rightarrow FAD^+ + H_2O + 能量$$

如果上述反应将能量一次性释放的话，就会太大，不仅不能全部收集和储存，还会使细胞受到损伤。为此，细胞利用线粒体内膜中一系列的电子载体（呼吸链），伴随着电子逐步传递，将 NADH 或 $FADH_2$ 进行氧化，自由能逐步收集最后用于 ATP 的合成，将能量储存在 ATP 的高能磷酸键。电子通过呼吸链的流动称为电子运输或电子传递，而将 ADP 转变成 ATP 称为磷酸化，伴随氧化进行的磷酸化就称为氧化磷酸化。

7.4.2.1 电子载体

在电子传递过程中与释放的电子结合并将电子传递下去的物质称为电子载体（electron carrier）。参与传递的电子载体有 4 种：黄素蛋白、细胞色素、铁硫蛋白和辅酶 Q。在这四类电子载体中，除了辅酶 Q 外，接受和提供电子的氧化还原中心都是与蛋白相连的辅基。

黄素蛋白（flavoprotein）　黄素蛋白是由一条多肽结合 1 个辅基组成的酶类，结合的辅基可以是 FAD 或 FMN，它们是维生素 B_2 的衍生物，每个辅基能够接受和提供两个质子和



血红素的氧化型　　血红素的还原型

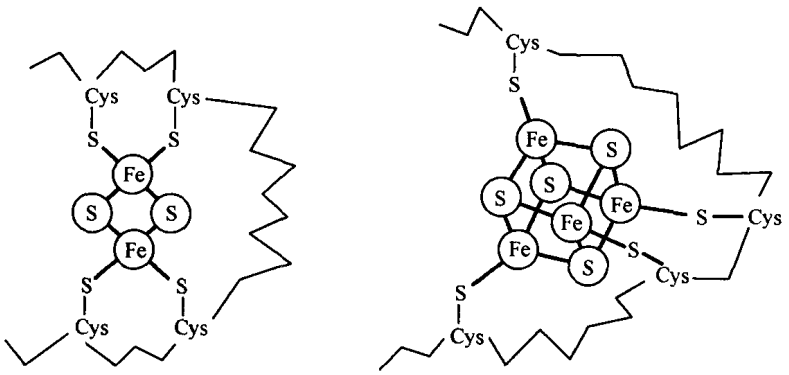
图 7-25　细胞色素 *c* 的血红素基团的结构及氧化还原状态的变化（引自 Karp, 1996）

四个吡咯环都含有侧链，不同的细胞色素所含侧链不同。图中所示是细胞色素 *c*，血红素与多肽的两个半胱氨酸共价结合，但在大多数细胞色素分子中，血红素并不与多肽共价结合。

两个电子（图 7-23）。

细胞色素（cytochrome）　细胞色素是含有血红素辅基（图 7-25）的一类蛋白质。血红素基团是由卟啉环结合一个铁原子（铁原子位于环的中央）构成的。与 NAD^+ 和 FAD 不同，在氧化还原过程中，血红素基团的铁原子可以传递单个的电子而不必成对传递。血红素中的铁通过 Fe^{3+} 和 Fe^{2+} 两种状态的变化传递电子。在还原反应时，铁原子由 Fe^{3+} 状态转变成 Fe^{2+} 状态；在氧化反应中，铁由 Fe^{2+} 转变成 Fe^{3+}。电子传递链中至少有 5 种类型的细胞色素：a、a_3、b、c 和 c_1，它们间的差异在于血红素基团中取代基和蛋白质氨基酸序列的不同。

铁硫蛋白（iron-sulfur protein，Fe/S protein）　铁硫蛋白是含铁的蛋白质，也是细胞色素类蛋白质。在铁硫蛋白分子的中央结合的不是血红素而是铁和硫，称为铁-硫中心（iron-sulfur center）。最常见的是在蛋白质的中央含有 4 个原子，其中两个是铁，另两个是硫，称为 [2Fe-2S]，或在蛋白质的中央含有 8 个原子，其中 4 个是铁，另 4 个是硫，称为 [4Fe-4S]，并且通过硫与蛋白质的半胱氨酸残基相连（图 7-26）。在铁硫蛋白中尽管有多个铁原子的存在，但整个复合物一次只能接受 1 个电子以及传递 1 个电子，并且也是靠 Fe^{3+}、Fe^{2+} 状态的循环变化传递电子。



(a) 2Fe-2S 型铁硫蛋白　　(b) 4Fe-4S 型铁硫蛋白

图 7-26　两种类型的铁硫蛋白的结构（引自 Alberts *et al*.，1998）

醌（uniquinone，UQ）*或辅酶 Q*（coenzyme Q）　辅酶 Q 是一种脂溶性的分子，含有长长的疏水链，由五碳类戊二醇构成。如同黄素蛋白，每一个醌能够接受和提供两个电子和质子（图 7-27），部分还原的称为半醌（UQH），完全还原的称为全醌（UQH_2）。

7.4.2.2　氧化还原电位与载体排列顺序

在线粒体内膜的呼吸链中，不同电子载体的排列顺序怎样？又是如何确定的？由于不同的还原剂具有不同的电子传递电位，而氧化与还原又是偶联的，如 NAD^+ 和 NADH. 它们的差别主要是电子数量不同，所以二者间就有一个电位差，即氧还电位（oxidation-reduction potential，redox potential）。构成氧化还原的成对离子或分子，称为氧化还原对，或氧还对（redox pair）。氧还电位可在标准条件下测定，即得标准氧化还原电位（standard oxidation reduction potential，E_0'）。标准氧化还原电位的值越小，提供电子的能力越强。所谓标准条件是指

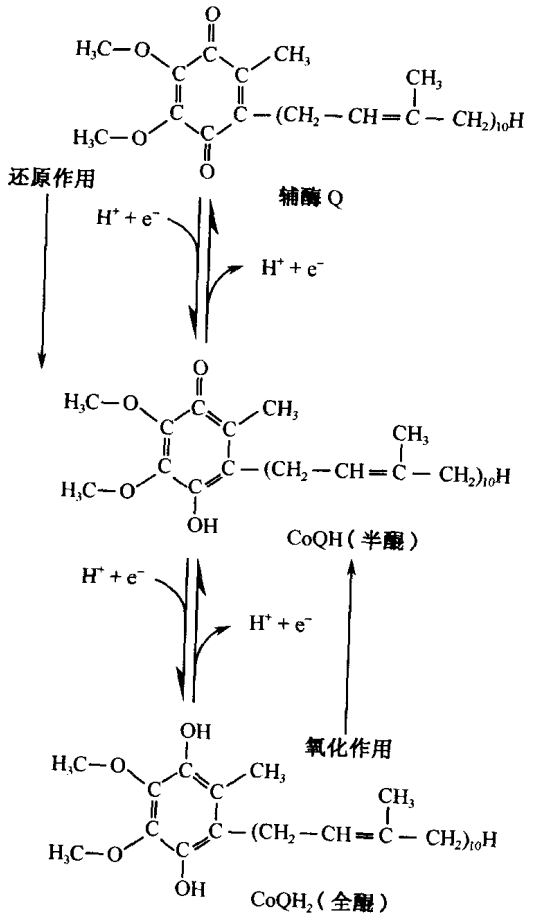


图 7-27　辅酶 Q 的氧化和还原形式（引自 Becker *et al*., 1996）

辅酶 Q 的氧化还原分两步进行，先接受一个电子，得到部分还原，称为半醌，再得到一个电子，成为完全还原的醌，称为全醌。全醌失去一个电子是部分氧化，称为半醌，两个电子全部失去，即完全氧化则称为氧化型的醌。

表 7-4　某些电子载体的标准氧还电位

氧化型	还原型	n	E_0'/V
NAD^+	$NADH + H^+$	2	−0.32
FMN	$FMNH_2$	2	−0.30
FAD	$FADH_2$	2	−0.22
丙酮酸	乳酸	2	−0.19
辅酶 Q	UQH_2	2	+0.04
细胞色素 b (Fe^{3+})	细胞色素 b (Fe^{2+})	1	+0.07
细胞色素 c_1 (Fe^{3+})	细胞色素 b (Fe^{2+})	1	+0.23
细胞色素 c (Fe^{3+})	细胞色素 b (Fe^{2+})	1	+0.25
细胞色素 a (Fe^{3+})	细胞色素 b (Fe^{2+})	1	+0.29
细胞色素 a_3 (Fe^{3+})	细胞色素 b (Fe^{2+})	1	+0.55
$1/2O_2 + H^+$	H_2O	2	+0.82

注：n = 传递的电子数。

1mol·L^{-1}反应浓度、25℃、pH7.0 和 1 个大气压，测得的氧还电位用伏特（V）表示。因此只要分别测定电子载体的氧化还原电位，再进行比较，可初步推断它们在呼吸链中的排列顺序。表 7-4 是测得的某些电子载体的标准氧还电位。

根据测得的标准氧化还原电位，按氧还电位的大小可排出电子载体在呼吸链中的位置（图 7-28）。

图中每一个载体都是从呼吸链中上一个载体获得电子被还原，而上一个载体由于失去电子被氧化，因此电子是从一个载体传向另一个载体，直至最终的受体被还

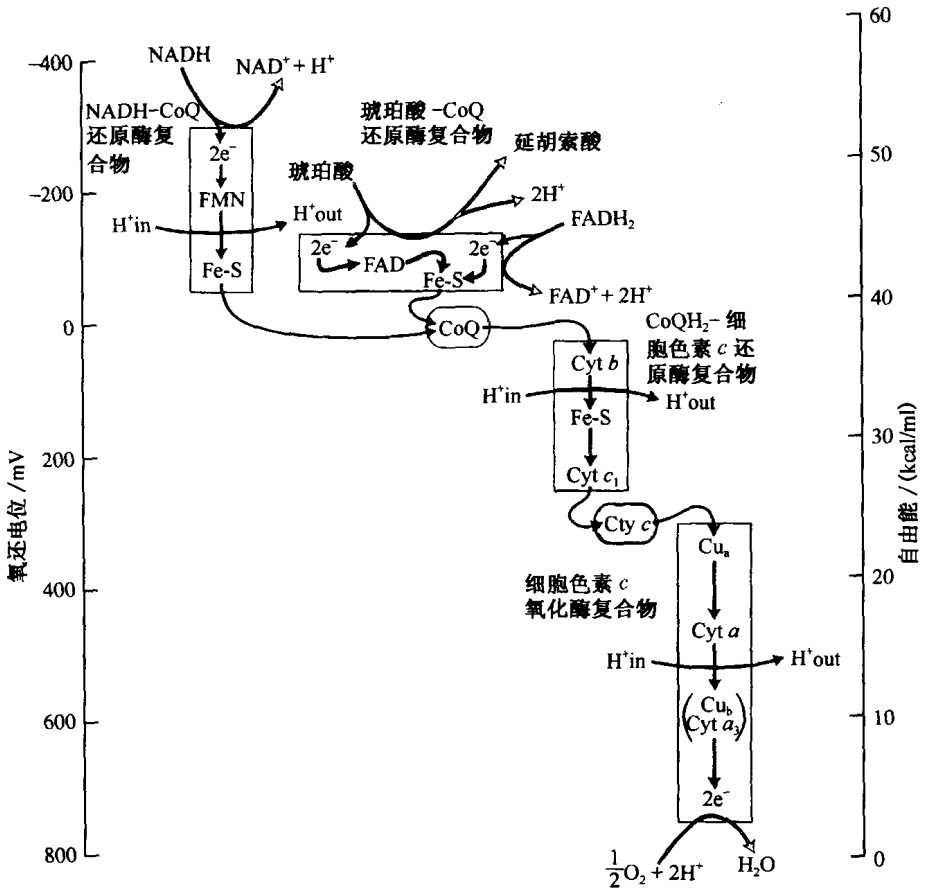


图 7-28　电子传递链中几种电子载体的氧还电位（引自 Lodish *et al.*，1999）

图中给出各电子载体近似的氧还电位，并标出了电子对沿呼吸链向分子氧传递形成的自由能，垂直箭头线表示产生的能量足够驱使质子穿过线粒体内膜，其后可为 ATP 合成提供能量。

原为止。在该呼吸链中的最终的受体是 O_2，接收电子后生成水。

值得注意的是，由于细胞内的条件与标准条件相差甚大，所以仅仅依据测定的标准氧化还原电位不一定能够准确地确定电子载体在线粒体内膜中的排列顺序，最直接的是根据光谱分析。由于载体的氧化还原状态不同，显示不同的光吸收光谱，这种差异称为差示光谱（difference spectrum）。

7.4.2.3　呼吸链的组成和排列

呼吸链中的 4 种电子载体在线粒体内膜中不是单一存在而是同其他的蛋白质组成复合物。当破坏了线粒体内膜后，能够从 4 种不同的复合物中分离出各种载体，这 4 种复合物是不同的、不对称的跨膜蛋白复合物，分别被命名为复合物 I、II、III 和 IV。在这 4 种复合物中都没有细胞色素 *c* 和辅酶 Q，这两种呼吸链的成分独立存在于线粒体膜中。辅酶 Q 溶于膜的脂双层，而细胞色素 *c* 是膜外周蛋白。因此，辅酶 Q 和细胞色素 *c* 是在膜内或沿着膜在大的、非移动的复合物间传递电子。一旦电子进入一个大的多蛋白的复合物中，电子就按既定的途径传递。

组成呼吸链的 4 种复合物又都是由几种不同的蛋白质组成的多蛋白复合体（图 7-29，表 7-5），功能是参与氧化还原作用，由于这些复合物在线粒体内膜中不停地移动，所以它们没有稳定的结构。

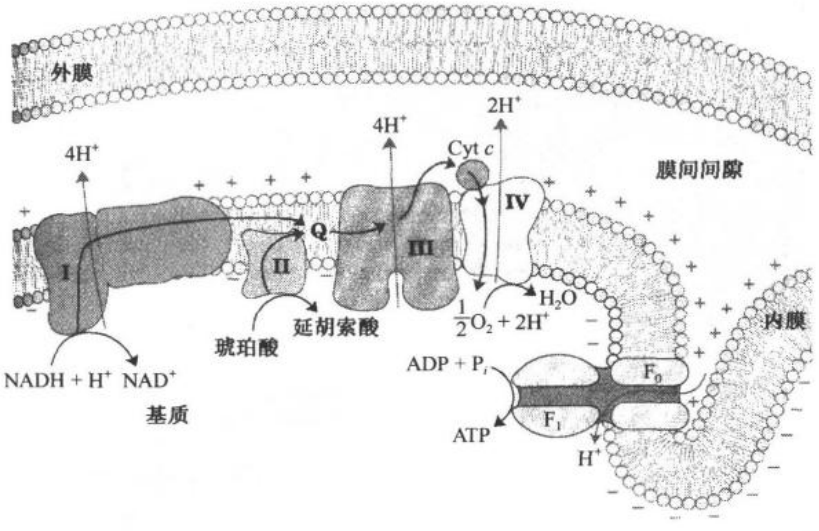


图 7-29　线粒体内膜电子传递复合物的排列及质子与电子传递示意图

（引自 Nelson *et al*.，2000）

呼吸链由四个含有电子载体的复合物及另两个独立存在的电子载体组成，进入呼吸链的电子可以来自 NADH 或来自 $FADH_2$。电子可以从复合物 I 或复合物 II 传递给 UQ，然后进一步传递给复合物 III、经由细胞色素 *c* 传递给复合物 IV，最后传递给 1/2 O_2，生成水。

表 7-5　线粒体呼吸链中四种复合物的性质

复合物		多肽数	辅基	电子传递		传递质子
序号	名称			接收自	传递给	
I	NADH 脱氢酶	≥34	1 个 FMN 6～9 个 Fe/S 中心	NADH	辅酶 Q	是
II	琥珀酸脱氢酶	4	1 个 FAD 3 个 Fe/S 中心	琥珀酸 （经由酶结合的 FAD）	辅酶 Q	否
III	细胞色素 b-c_1 复合物	10	2 个细胞色素 b 1 个细胞色素 c_1 1 个 Fe/S 中心	辅酶 Q	细胞色素 c	是
IV	细胞色素 c 氧化酶	10	1 个细胞色素 a 1 个细胞色素 a_3 2 个 Cu 中心（其中细胞色素 a_3 是 Fe/Cu 中心）	细胞色素 c	氧（O_2）	是

复合物 I（complex I）　复合物 I 又称 NADH 脱氢酶（NADH dehydrogenase）或 NADH-CoQ 还原酶复合物，功能是催化一对电子从 NADH 传递给 CoQ，它是线粒体内膜中最大的蛋白复合物，是跨膜蛋白，也是呼吸链中了解最少的复合物。哺乳动物的复合物 I 含有 42 种不同的亚基，总分子质量差不多有 1 000kDa。其中有 7 个亚基都是疏水的跨膜蛋白，由线粒体基因编码。复合物 I 含有黄素蛋白（FMN）和至少有 6 个铁硫中心。一对电子从复合物 I 传递时伴随着 4 个质子被传递到膜间隙（图 7-30）。

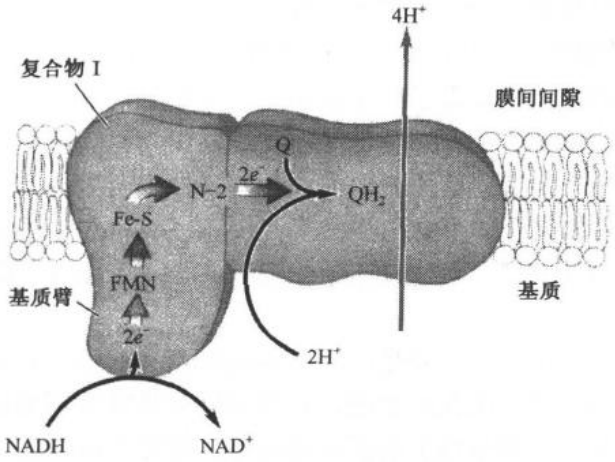


图 7-30　复合物 I 的结构和功能（引自 Nelson *et al.*，2000）

复合物 II（complex II）　复合物 II 又称为琥珀酸脱氢酶（succinate dehydrogenase）或琥珀酸-CoQ 酶复合物，功能是催化电子从琥珀酸传递给辅酶 Q，由几个不同的多肽组成，其中有两个多肽组成琥珀酸脱氢酶，并且是膜结合蛋白。复合物 II 参与的是低能电子传递途径，将琥珀酸的电子经 FAD 传给 CoQ。复合物 II 传递电子时不伴随氢的传递。

复合物 III（complex III）　复合物 III 又称 $CoQH_2$-细胞色素 *c* 还原酶复合物，总分子质量为 250kDa。含 1 个细胞色素 c_1、1 个细胞色素 *b*（有两个血红素基团）、1 个铁硫蛋白，其中细胞色素 *b* 由线粒体基因编码。复合物 III 催化电子从辅酶 Q 向细胞色素 *c* 传递，并且每传递一对电子，同时传递 4 个 H^+ 到膜间隙。

复合物 IV（complex IV）　复合物 IV 又称细胞色素 *c* 氧化酶（cytochrome *c* oxidase）。总分子质量为 200kDa。复合物 IV 是以二聚体的形式存在，它的亚基 I 和 II 都含有 4 个氧化还原中心和两个 *a* 型细胞色素（含有 1 个 *a*、1 个 a_3）和两个 Cu。主要功能是将电子从细胞色素 *c* 传递给 O_2 分子，生成 H_2O：$4\ Cyt\ c^{2+} + O_2 + 4\ H^+ \rightarrow 4\ Cyt\ c^{3+} + 2\ H_2O$。每传递一对电子，要从线粒体基质中摄取 4 个质子，其中两个质子用于水的形成，另 2 个质子被跨膜转运到膜间隙。

由于线粒体中需要经呼吸链氧化和电子传递的主要是 NADH，而 $FADH_2$ 较少，可将呼吸链分为主、次呼吸链。①主呼吸链由复合物 I、III 和 IV 构成，从 NADH 来的电子依次经过这 3 个复合物，进行传递。②次呼吸链由复合物 II、III、IV 构成，来自 $FADH_2$ 的电子不经过复合物 I。

7.4.2.4 递氢体与电化学梯度的建立

组成呼吸链的成员中除了电子载体外，有些还具有将质子跨膜传递到膜间间隙的作用，将能够传递氢质子的复合物称为递氢体。质子从线粒体基质跨膜传递到线粒体膜间间隙是一种耗能的过程，递氢体利用电子在呼吸链中传递时释放的自由能完成递氢过程。实际上，正是呼吸链中的递氢体通过对质子的跨膜传递，将 NADH 和 $FADH_2$ 在氧化过程中释放出来的自由能转变成势能，这种势能可进一步用于 ATP 的合成。

质子跨过内膜向膜间间隙的转运也是一种电生成（electrogenesis），即电压生成的过程。因为质子跨膜转运使得膜间间隙积累了大量的质子，建立了质子梯度。由于膜间间隙质子梯度的建立，使内膜两侧发生两个显著的变化：一是线粒体膜间间隙产生大量的正电荷，而线粒体基质产生大量的负电荷，使内膜两侧形成电位差；二是两侧氢离子浓度的不同因而产生 pH 梯度（ΔpH），这两种梯度合称为电化学梯度（electrochemical gradient）。线粒体内膜两侧电化学梯度的建立，能够形成质子动势（proton-motive force，Δp），只要有合适的条件即可转变成化学能储存起来。

膜间间隙对质子梯度的维持，主要是靠内膜的高度不通透性，否则，由于质子的扩散使得质子回流到线粒体基质，从而流失自由能。而内膜恰恰是高度不通透性的，递氢体转运到膜间间隙的质子得以维持，也就维持了质子移动的力，可用于 ATP 的合成。

7.4.3 氧化磷酸化：ATP 形成机制

氧化磷酸化（oxidative phosphorylation）是指在活细胞中伴随着呼吸链的氧化作用所发生的能量转换和 ATP 的形成过程。

7.4.3.1 呼吸链含有 3 个氧化磷酸化偶联位点

早在 20 世 30 年代，Belitzer 首先提出电子传递与 ATP 合成偶联的假设。他在体外测定肌组织制备物合成 ATP 与氧消耗比值时发现，呼吸链每传递 1 对电子至少可合成 2 个 ATP。后来有人发现 P/O 比值（形成的 ATP 数与每个还原氧的比值）接近 3，也就是说可合成 3 分子 ATP。根据对呼吸链中不同复合物间氧化还原电位的研究，发现复合物 I、III、IV 每传递 1 对电子，释放的自由能都足够合成 1 分子 ATP，因此将复合物 I、III、IV 看成是呼吸链中电子传递与氧化磷酸化偶联的 3 个位点。

上述 ATP 合成的数量和偶联位点得到实验的支持。如将分离的线粒体内膜小泡与抗霉素（antimycin）一起温育，由于抗霉素阻止电子通过细胞色素 b-c_1（复合物 III），NADH 释放的电子只能传递到辅酶 Q，其结果，每传递 1 对电子只合成 1 分子 ATP。因此可以推论复合物 I 是 ATP 合成的偶联位点。用同样的方法证明复合物 III 和复合物 IV 也都是 ATP 合成与电子传递偶联位点。

如果以 $FADH_2$ 作为电子供体，则只有两个 ATP 合成偶联位点。因为 $FADH_2$ 提供的电子是经复合物 II、III 和 IV 传递的，而复合物 II 不能作为 ATP 合成的偶联位点，所以只有两个偶联位点，这就意味着由 $FADH_2$ 作为电子供体时，只能合成两分子的 ATP。

7.4.3.2 偶联因子 1 的发现及功能预测

在 20 世纪 70 年代初，Moran 用负染技术检查分离的线粒体时发现：线粒体内膜的基质一侧的表面附着一层球形颗粒，球形颗粒通过柄与内膜相连（图 7-31）。

几年后，Racker 分离到内膜上的颗粒，称为偶联因子 1（coupling factor 1），简称 F_1。Racker 发现这种颗粒很像水解 ATP 的酶，即 ATPase，这似乎是一个特别的发现，为什么线粒体内膜需要如此多的水解 ATP 的酶？

如果按照常规的方式思考所发现颗粒的问题，似难理解线粒体内膜上需要如此多的 ATP 水解酶，如果将 ATP 的水解看成是 ATP 合成的相反过程，F_1 球形颗粒的功能就显而易见了：它含有 ATP 合成的功能位点，即 ATPase 既能催化 ATP 的水解，又能催化 ATP 的合成，到底行使何种功能，视反应条件而定。现在将这种既具有合成作用又具有水解作用的酶称为合酶（synthase）。

为了证明上述推测是正确的，改用别的 ATPase，如用质膜中的 Na^+/K^+-ATPase 进行体外实验。在细胞质膜中，该酶的功能是水解 ATP 进行 K^+ 的逆浓度梯度运输，这是该酶在细胞质膜中的惟一功能。但是，改变反应条件，该酶却具有合成 ATP 的作用（图 7-32）。

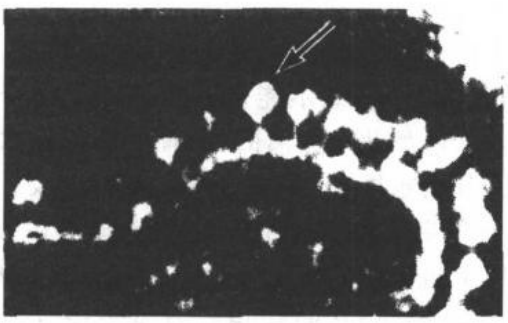


图 7-31 ATP 偶联因子（引自 Karp，1996）
牛心脏线粒体的负染电镜照片，可见球形颗粒通过小柄附着在线粒体内膜嵴上。

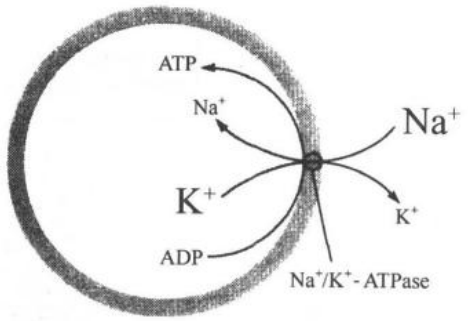


图 7-32 利用红细胞血影和 Na^+/K^+-ATPase 重组小泡进行的 ATP 合成实验（引自 Karp，1996）
图中大号字母表示离子的高浓度。

实验采用红细胞。首先制备含有 Na^+/K^+-ATPase 和高 K^+ 离子浓度的红细胞血影，然后将之放入具有极高浓度的 Na^+ 环境中，“细胞”内的 K^+ 向外移动，而 Na^+ 向细胞内移动。这两种离子都是沿各自的浓度梯度向下移动，而不像在生活细胞中那样逆浓度梯度移动。如果在红细胞血影中加入 ADP 和 P_i，离子的移动会引起 ATP 的合成而非 ATP 的水解。

上述实验结果表明，在科学研究中，不能总是按常规思维去认识事物，反向理论有时有重要作用，上述结果是根据酶催化反应的反向理论去认识酶的作用后发现的。同时，该实验也证明了离子梯度能够驱使 ADP 磷酸化合成 ATP。可以用这一结果预测在线粒体膜间间隙中由电子传递所建立的质子移动力可用于 ATP 的合成。实验中合成 ATP 必须满足 3 个条件：要有膜结合的 ATP 合酶、离子梯度、合成 ATP 的化学材料（ADP 和 P_i），这 3 个条件在线粒体内膜的两侧都是具备的。

7.4.3.3 ATP 合酶的功能鉴定：线粒体膜重建实验

为了证明 F_1 具有 ATP 合酶的作用，人们试图进行线粒体膜的重建实验，主要是将线粒体内膜与其嵴上的 F_1 颗粒分离出来，重新装配后研究 F_1 的功能。实验中先分离附着有 F_1 颗粒的线粒体内膜小泡，然后将小泡置于加有 NADH、ADP 和无机磷的溶液中，这些小泡能够将 NADH 的电子经由小泡膜中呼吸链逐步传递给 O_2，偶联合成了 ATP。

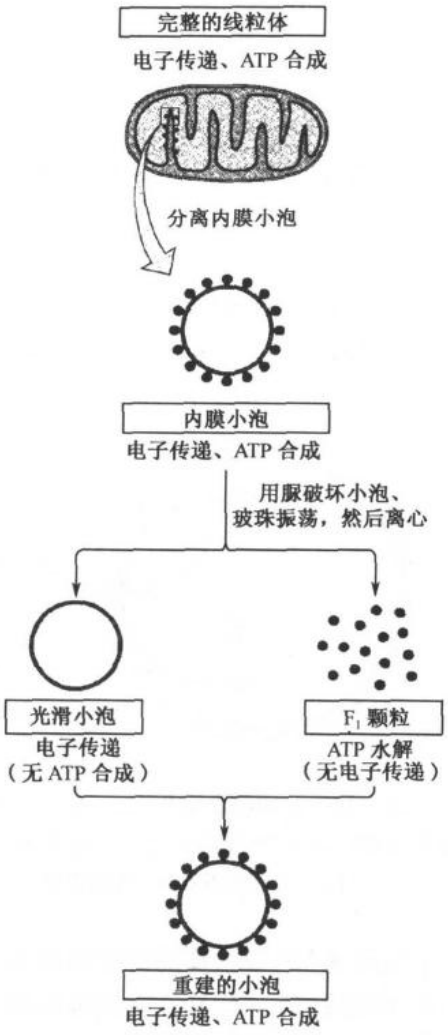


图 7-33 线粒体内膜重建实验
（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

Racker 实验室第一个成功进行了含有 F_1 颗粒的线粒体内膜小泡的拆装。首先分离完整的线粒体，然后用超声波处理使线粒体破裂。破裂的线粒体内膜能够自封闭成内膜小泡，其上结合有 F_1 颗粒，然后用脲处理或用玻珠与内膜小泡一起振荡，使内膜上附着的 F_1 颗粒脱落，形成没有颗粒附着的内膜小泡，将处理的样品离心后，分别收集沉淀和上清液。在显微镜下检查收集的沉淀都是表面光滑的小泡。经功能实验，这种光滑型的内膜小泡只有电子传递的功能而没有合成 ATP 的能力。实验收集的上清液中含有从内膜脱落的 F_1 颗粒，经检查，这种颗粒既不能传递电子又不能合成 ATP。非但如此，分离的 F_1 颗粒却能够水解 ATP，其功能与结合在线粒体内膜时相反。根据这一结果推测，F_1 的正常功能是附着在线粒体内膜上进行 ATP 的合成，若是脱离了内膜则具有水解 ATP 的作用，因为失去了合成 ATP 所需要的质子动势。

这种假说得到实验的证实。将分离的 F_1 颗粒与光滑的线粒体内膜小泡结合，使 F_1 颗粒重新附着到线粒体内膜上，这种重建的含有 F_1 颗粒的线粒体小泡不仅能够进行电子传递，而且具有 ATP 合成的能力（图 7-33）。通过线粒体内膜重建实验，人们得出这样的结论：线粒体内膜中的 F_1 颗粒是一种 ATP 合酶，它是呼吸链上氧化（放能）和磷酸化（储能）的偶联装置。

7.4.3.4 ATP 合酶的结构和功能

从电镜照片看，线粒体 ATP 合酶（ATP synthase）的结构可分为两个基本部分：F_1、F_0，在 F_1 和 F_0 之间有一个细细的柄。球形头部的直径约 9nm，膜部的宽度约 11nm，高度约

9nm，柄部的高度约 4.5nm，宽度约 2nm（图 7-34）。ATP 合酶的别名很多，如：F_0F_1 复合物（F_0F_1 complexes）、F_0F_1-ATP 合酶（F_0F_1-ATP synthase）、F_0F_1-ATP 酶（F_0F_1-ATPase）、F_0F_1-ATPase 复合物（F_0F_1-ATPase complexes）等。

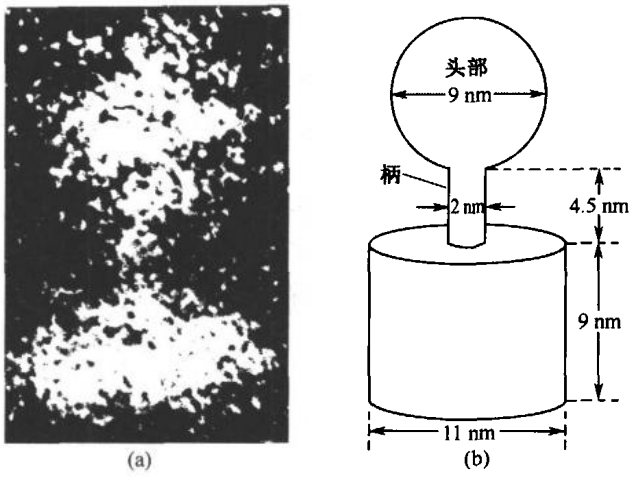


图 7-34　ATP 合酶的形态（引自 Wolfe，1993）
（a）电镜照片；（b）根据电镜照片绘制的模式图和各部分的大小。

后来的研究发现 ATP 合酶是一个多组分的结构。在分离状态下具有 ATP 水解酶的活性，在膜结合状态下具有 ATP 合成酶的活性。估计在典型的哺乳动物肝细胞线粒体内膜上大约有15 000个 ATP 合酶。除了线粒体中有 ATP 合酶外，植物叶绿体的类囊体和好氧细菌都有 ATP 合酶的同源物。线粒体 ATP 合酶的分子组成和主要特点如下。

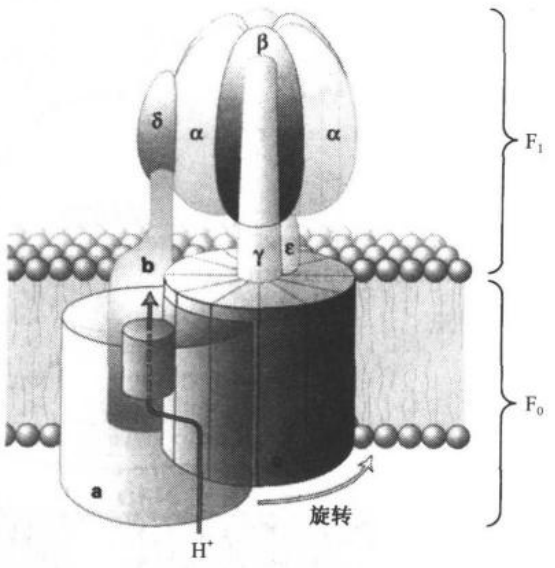


图 7-35　ATP 合酶的结构和组成
（引自 Lodish *et al*.，1999）

头部（head section）　头部即 F_1，细菌和线粒体 ATP 合酶的 F_1 都是水溶性的蛋白，结构相似，由 5 种多肽（α、β、γ、δ 和 ε）组成的九聚体（$\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$），α 亚基和 β 亚基构成一种球形的排列，头部含有 3 个催化 ATP 合成的位点，每个 β 亚基含有一个。

柄部（stalk section）　由 F_1 的 γ 亚基和 ε 亚基构成柄部，将头部与基部连接起来。γ 亚基穿过头部作为头部旋转的轴。构成基部的亚基 b 向外延伸成为柄部的构成部分。

膜部（membrane section）　即 F_0，是由镶嵌在线粒体内膜的疏水性蛋白质所组成，由 3 种不同的亚基组成的十五聚体（1a:2b:12c）。其中 c 亚基在膜中形成物质运动的环，b 亚基

穿过柄部将 F_1 固定；a 亚基是质子运输通道，允许质子跨膜运输（图 7-35）。

ATP 合酶含有 8 种多肽链，分子质量为 480～500kDa，占内膜总蛋白的 15%。也有学者将它看成是线粒体内膜呼吸链的第五个复合物（complex V）。

7.4.3.5 氧化磷酸化偶联机理：化学渗透假说

关于氧化磷酸化的偶联机理，先后提出过几种假说，如化学偶联假说（chemical coupling hypothesis）和构象偶联假说（conformational coupling hypothesis），这些假说由于证据不足得不到公认。

英国生物化学家 Mitchell 于1961年提出了化学渗透假说(chemiosmotic coupling hypothesis)解释氧化磷酸化的偶联机理。该学说认为：在电子传递过程中，伴随着质子从线粒体内膜的里层向外层转移，形成跨膜的氢离子梯度，这种势能驱动了氧化磷酸化反应(提供了动力)，合成了 ATP。这一学说具有大量的实验证明，得到公认并获得了1978年诺贝尔化学奖。化学渗透学说可以很好地说明线粒体内膜中电子传递、质子动势的建立、ADP 磷酸化的关系(图7-36)。

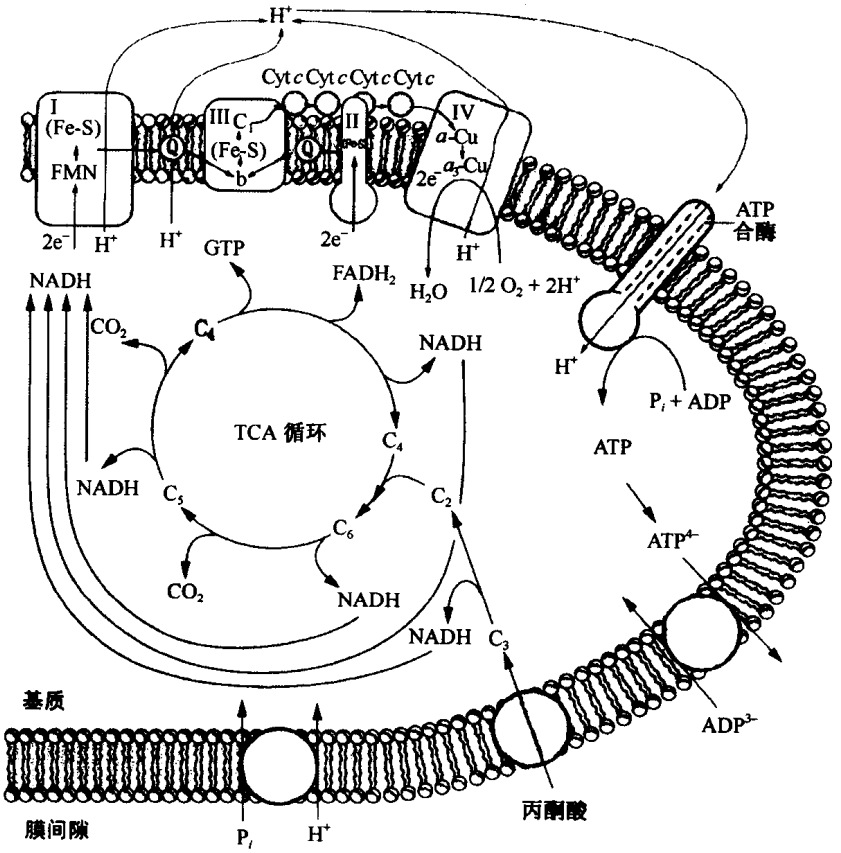


图 7-36 线粒体在有氧呼吸中的主要作用（引自 Karp, 1996）

主呼吸链 ①电子传递从 NADH 开始，复合物 I 将还原型的 NADH 氧化，释放出的两个电子和一个 H^+ 质子被 NADH 脱氢酶上的黄素单核苷酸（FMN）接受，同时从基质中摄取一个 H^+ 将 FMN 还原成 $FMNH_2$，NADH 被氧化成 NAD^+ 重新进入 TCA 循环；②$FMNH_2$ 将一对 H^+ 质子传递到膜间间隙，同时将一对电子经铁硫蛋白传递给 Q 池中的两个辅酶 Q；

③两个辅酶 Q 得到电子后从基质中摄取两个 H^+ 被还原成两个半醌（QH）；④醌在内膜中通过扩散进行穿膜循环（醌循环），两个半醌各从细胞色素 *b* 获得一个电子，并从基质中再摄取两个 H^+ 质子，形成两个全醌（QH_2）；⑤当全醌扩散到内膜外侧时，便把两个电子传递给细胞色素 c_1，并向膜间间隙释放一对 H^+ 质子，本身又被氧化成半醌；⑥当半醌扩散到接近细胞色素 *b* 时，将携带的另两个电子传递给细胞色素 *b*，并又向膜间间隙释放一对 H^+，细胞色素 *b* 的一对电子又回到醌循环；⑦细胞色素 c_1 将接受的两个电子经细胞色素 *c* 和细胞色素氧化酶传递给氧，将氧还原成 H_2O；⑧一对电子经呼吸链传递到氧时，共将基质中 5 对 H^+ 泵到膜间间隙，从而使膜间间隙的 H^+ 浓度高于基质，因而在内膜的两侧形成了电化学梯度。这种电化学梯度可驱动 H^+ 通过 ATP 合酶复合物进入基质，估计每通过 2 个 H^+ 可合成 1 个 ATP。

次呼吸链　电子传递方式同主呼吸链，只是起始电子供体是 $FADH_2$，不经过复合物 I，并且复合物 II 不是递氢体，所以传递的 H^+ 质子少 2 个，最后产生的能量也要少些。

7.4.3.6 ATP 合酶合成 ATP 的机制

ATP 合酶合成 ATP 的分子机制的研究一直是研究的热点。为多数人接受的 ATP 合酶合成 ATP 的模型是结合改变模型（binding-change model）。该模型认为 F_1 中的 γ 亚基作为 C 亚基旋转中心中固定的转动杆，旋转时会引起 αβ 复合物构型的改变。有 3 种不同的构型，对 ATP 和 ADP 具有不同的结合能力：①O 型几乎不与 ATP、ADP 和 P_i 结合；②L 型同 ADP 和 P_i 的结合较强；③T 型与 ADP 和 P_i 的结合很紧，能生成 ATP，并能与 ATP 牢牢结合。当 γ 亚基旋转并将 αβ 复合物转变成 O 型则会释放 ATP（图 7-37）。

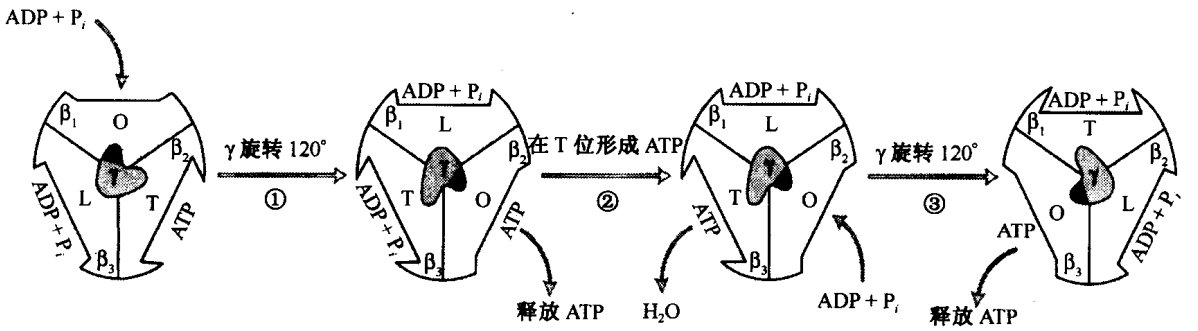


图 7-37　结合变构模型（引自 Lodish *et al*., 1999）

现已了解，当质子通过 F_0 流入线粒体基质时，F_1 中便合成了 ATP，而这个合成过程是完全可逆的。当质子经 F_0 流出时，F_1 便会水解 ATP。质子流经 F_0 部分与在 F_1 部分中 ATP 的合成/水解这两个过程可能是通过 F_0 与 F_1 间共轴旋转相偶联。由于在 F_1 内部的旋转运动可合成/水解 ATP，因此 F_1-ATP 酶被认为是一种分子螺旋发动机。

目前已经可以在光学显微镜下观察到 F_1 中 γ 亚基的旋转运动（图 7-38），但现在还没有直接的证据显示在 F_0 中有某些亚基作旋转运动。

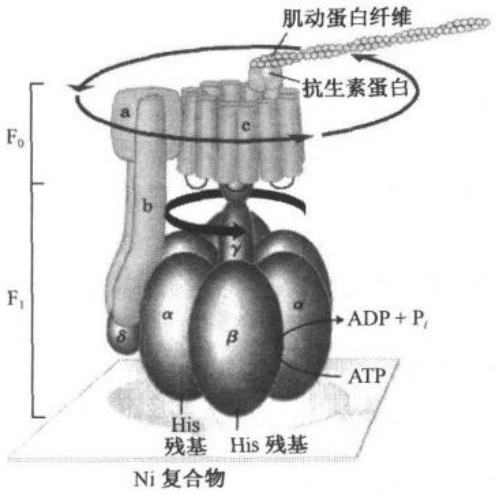


图 7-38　F_1 和 γ 旋转的体外实验示意图（引自 Nelson *et al*.，2000）

实验中对 F_1 进行人工改造，使之带上组氨酸（每个亚基一个），由于组氨酸能够同覆盖有金属还原剂（Ni 复合物）的玻片结合，因此可使 F_1 固定到这种玻片上。通过人工的方法将 γ 结合上一条荧光标记的肌动蛋白纤维，然后在供给 ATP 的情况下用荧光显微镜观察 γ 亚基的转动。

7.5　线粒体的遗传、增殖和起源

7.5.1　线粒体遗传

线粒体是半自主性的细胞器，它除了有自己的遗传物质——线粒体 DNA 外，还有蛋白质合成系统（核糖体、mRNA、rRNA、tRNA）。但是，它的遗传信息量不足，仍然要受控于核的遗传信息，也就是说，线粒体中的蛋白质只有少数几种是线粒体基因编码的，大多数线粒体蛋白质还是由核基因编码。所以线粒体的生物合成涉及两个彼此分开的遗传系统。

7.5.1.1　线粒体的基因组

线粒体的自主性主要表现是具有自己的遗传体系和蛋白质合成系统。线粒体 DNA (mtDNA)是双链环状分子（图 7-39），基因组的大小变化很大，动物细胞线粒体基因组较小，约 16.5kb，每个细胞中有几百个线粒体，每个线粒体有多个 DNA 拷贝，但是线粒体 DNA 的总量不到核基因组的 1%。

酵母线粒体基因组较大，裂殖酵母线粒体基因组可达 80kb。线粒体 DNA 的 A－T 含量丰富，但碱基甲基化程度比核 DNA 低得多。mtDNA 通常与线粒体内膜结合在一起。

人的线粒体基因没有发现内含子，但在酵母线粒体至少在两个基因中发现有内含子，如细胞色素氧化酶复合物亚基 I 蛋白基因中就有 9 个内含子。

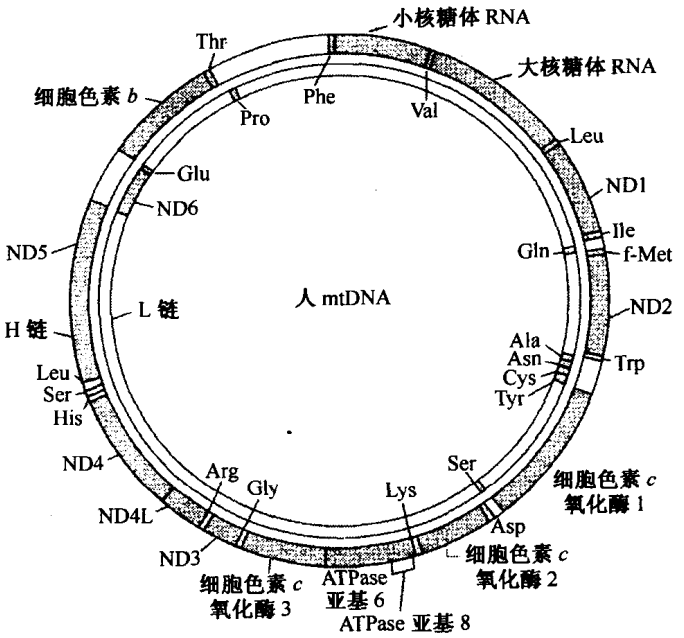


图 7-39　人的线粒体基 DNA（mtDNA）（引自 Lodish *et al*.，1999）
该 DNA 已完成测序，图中标出了相应的编码区

7.5.1.2　线粒体基因复制及转录

人的线粒体 DNA 中有两个线粒体 rRNA 基因：12S rRNA 和 16S rRNA 基因、22 种线粒体合成蛋白质所需的 tRNA 基因和 13 种编码蛋白质的基因。由于不同生物线粒体基因组大小不同，遗传信息量也不相同（表 7-6）。

线粒体 DNA 在核基因编码的 DNA 聚合酶的作用下以 D 环方式进行复制，这种 DNA 聚合酶是线粒体特异的。线粒体的复制期主要在细胞周期的 S 期和 G_2 期，与细胞周期同步。线粒体 DNA 是对称转录的，即在线粒体 DNA 的 H 链（重链）和 L 链（轻链）上各有一个启动区，从各自的启动区开始全长对称转录合成前 RNA，经切割加工后执行生物学功能。

表 7-6　已鉴定的线粒体基因

基因	人	酵母	植物
核糖体 RNA			
大亚基	16S	21S	26S
小亚基	12S	15S	18S
5S RNA	−	−	+
tRNA	22	24	~30
核糖体蛋白	0	1	+
RNase P（RNA 成分）	−	+	?
NADH 脱氢酶亚基	7	0*	6?
细胞色素 *b*	+	+	+
细胞色素氧化酶亚基	3	3	3
ATP 合酶亚基	2	3	4

注：+：表示存在；−：表示不存在；
*：某些真菌可编码 6 个亚基。

7.5.1.3　线粒体密码

线粒体使用核基因的通用密码，但也有些例外（表 7-7）。

线粒体的蛋白质合成基本上属于原核类型，具有原核生物蛋白质合成的特点，如：mRNA的转录和翻译是在同一时间和地点进行、蛋白质合成的起始 tRNA 与原核生物的相同、

蛋白质合成对药物的敏感性与细菌一样。如氯霉素可抑制线粒体的蛋白质合成，而不抑制细胞质的蛋白质合成；放线菌酮可抑制细胞质蛋白质的合成而不抑制线粒体蛋白质的合成。

表 7-7　线粒体中特殊遗传密码

密码子	“通用”密码	线粒体密码			
		哺乳动物	果蝇	酵母	植物
UGA	终止	色氨酸	色氨酸	色氨酸	终止
AUA	异亮氨酸	甲硫氨酸	甲硫氨酸	甲硫氨酸	异亮氨酸
CUA	亮氨酸	亮氨酸	亮氨酸	苏氨酸	亮氨酸
AGA、AGG	精氨酸	终止	丝氨酸	精氨酸	精氨酸

7.5.1.4　两套遗传体系的协同性

通过离体实验发现两套遗传体系的遗传机制不同。如放线菌酮是细胞质蛋白质合成抑制剂，但是对细胞器蛋白质的翻译却没有作用。另外，一些抗生素，如氯霉素、四环素、红霉素等能够抑制线粒体蛋白质的合成，但对细胞质蛋白质合成没有多大影响。通过对转录的抑制研究，发现线粒体基因转录的 RNA 聚合酶也是特异的（图 7-40）。

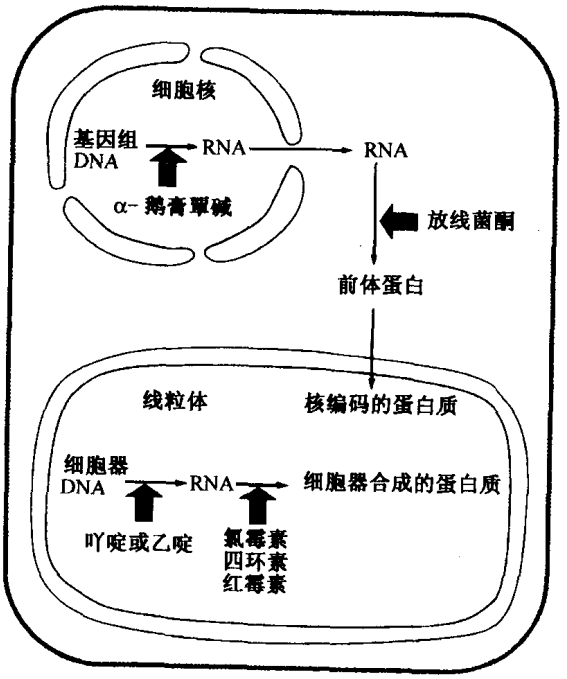


图 7-40　线粒体蛋白质生物合成的抑制作用
（引自 Alberts *et al*., 1994）
粗箭头所指是蛋白质合成抑制剂作用位点，线粒体与细胞核基因转录的抑制剂是不同的。

虽然线粒体有自己的 DNA 及相应的遗传机制，但由于基因数量有限，组成线粒体的蛋白质大部分是由细胞核基因编码，所以自主性是有限的。线粒体中的一些功能蛋白都是由线粒体基因和核基因共同编码，必然要求两套遗传体系能够很好地相互协调。如线粒体的 RNA 聚合酶是核基因编码的，并且是线粒体特异的，何时需要该酶，何时不需要？核基因编码的线粒体结构蛋白和酶蛋白需要通过跨膜转运，何时转运、如何控制转运的量？这些都要很好地进行协调。

这两套系统是相互调节的，线粒体的蛋白质合成靠核基因编码的酶起作用。反过来，线粒体的蛋白质合成也对核基因的活动进行调节。1973 年，Küntzel 等以链孢菌为材料通过抑制实验获得一些有意义的结果。

氯霉素的抑制实验　实验分两组进行：第一组是将链孢菌接种在加有氯霉素的培养基中培养，发现线粒体 RNA 和蛋白质的合成都受到阻抑，但线粒体所含有的 RNA 聚合酶等有关线粒体基因表达的酶的活性反而增高；而对照（即不加氯霉素）组的线粒体中 RNA 聚合酶等与线粒体基因表达有关的酶的活性只有实验组的一半。

根据这一结果可以推测线粒体的 RNA 聚合酶不是线粒体基因编码的，是由核基因编码并在细胞质中合成后转运进来的，但不能说明为什么实验组的酶活性高的问题。

EB 的抑制实验　实验同样分两组进行，抑制剂采用专一性抑制线粒体 DNA 转录的溴化乙啶（EB）：

实验组：链孢菌 → 培养（+EB）→ 分析 RNA 聚合酶的活性；

对照组：链孢菌 → 培养（不加 EB）→ 分析 RNA 聚合酶的活性；

结果：第一组 RNA 聚合酶的活性很高，第二组 RNA 聚合酶的活性很低（几乎测不出）。

据此推测：由于 EB 专一性地抑制线粒体 DNA 的转录，而线粒体中 RNA 聚合酶活性却很高，说明 RNA 聚合酶不是线粒体基因编码的。

上述两个实验结果，无论是抑制了线粒体 DNA 的转录（加 EB）还是抑制线粒体的蛋白质合成（加氯霉素），都使线粒体中 RNA 聚合酶的活性提高，说明该酶是由核基因编码（没有受到抑制），但为什么会提高呢？Küntzel 等提出了一种假设来解释这一现象。

在线粒体的蛋白质合成系统中能够合成一种起阻遏物作用的蛋白质，它对细胞核中合成有关线粒体蛋白质的酶起阻抑作用。由于氯霉素和 EB 都是抑制了线粒体的蛋白质合成，阻遏物不能形成，从而失去阻抑作用。

根据这一假设，可以进一步认为：在链孢菌中，线粒体的生物合成分两个阶段进行：第一阶段是通过核-质蛋白质合成体系，合成线粒体基因转录所需的各种酶类并转运进线粒体，接着就进入第二阶段，即线粒体 DNA 开始转录和翻译，合成组成线粒体的部分蛋白质，同时也产生了控制核 DNA 转录的阻遏物，抑制核对线粒体所需蛋白（或酶）合成的转录。当核基因编码的有关线粒体蛋白质合成酶用完后，线粒体 DNA 的作用也随即停止，影响核 DNA 转录的阻遏物也就不再形成，于是核基因又重新开始转录，即下一轮线粒体蛋白质生物合成过程重新开始。

7.5.2　线粒体的增殖与起源

7.5.2.1　线粒体的增殖方式

线粒体是半自主性的细胞器，那么线粒体如何控制自身的生长和发育？新的线粒体是如何产生的？关于这些问题，曾提出过 3 种解释：①现有线粒体生长到一定的大小就要开始分裂，形成两个小的、新的线粒体；②旧的线粒体被吞噬，细胞内利用脂、蛋白质、DNA 等重新合成线粒体；③利用其他的膜，如质膜、核膜、内质网膜等重新装配新的线粒体。后来在显微镜下观察到生活细胞中线粒体的分裂（图 7-41），支持了第一种观点：线粒体通过分裂进行增殖。

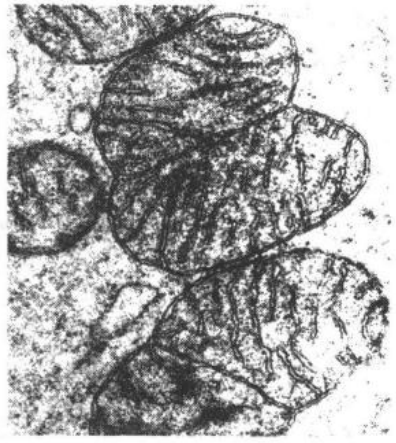


图 7-41　脂肪细胞中正在分裂的线粒体电镜照片（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

为了证明显微镜下观察到的线粒体分裂增殖的可靠性，1965 年 Luck 通过放射性标记实验，进一步支持了

线粒体分裂增殖的观点。

首先将脉孢菌（胆碱缺陷突变株）培养在加有^{3}H标记的胆碱（一种磷脂的前体物）培养基中，使线粒体的膜带上放射性标记。然后收集细胞，转入非同位素的培养基中继续培养，分别在不同培养时间收集菌体，再通过放射自显影检查经过不同时期培养的细胞中同位素的分布。并预测同位素的分布应是下述3种模式中的一种：①如果新的线粒体是由已有线粒体的生长和分裂而来，那么每分裂一次，线粒体中的放射性就会减少一半；②如果新线粒体是重新合成的，那么，新线粒体应该没有放射性，而老线粒体的放射性应与原初的相同；③如果新线粒体是由其他的膜重新装配而来，那么原有的线粒体仍然保持原有的放射性，而新的线粒体在开始阶段应具有放射性，随着时间的延长，放射性会逐渐消失。

表 7-8　证明线粒体的生长和发育方式的同位素标记实验结果

标记后培养的代数	实测的放射性	预测的合成方式及放射性		
		生长和分裂	重新合成	膜装配
1	2.0	2.0	2	应介于
2	1.0	1.0	2	前二者
3	0.5	0.5	2	之间
4	0.25	0.25	2	

结果发现：随分裂次数的增加，放射性的线粒体数量增多，放射性均匀分布到新的线粒体中，并逐渐减弱，实验结果表明线粒体是通过分裂增殖的（表7-8）。

7.5.2.2　线粒体起源

关于线粒体的起源有两种假说：内共生学说和非内共生学说。

内共生学说（endosymbiont hypothesis）　该学说认为线粒体来源于细菌，即细菌被真核生物吞噬后，在长期的共生过程中，通过演变，形成了线粒体（图7-42）。该学说认为：线

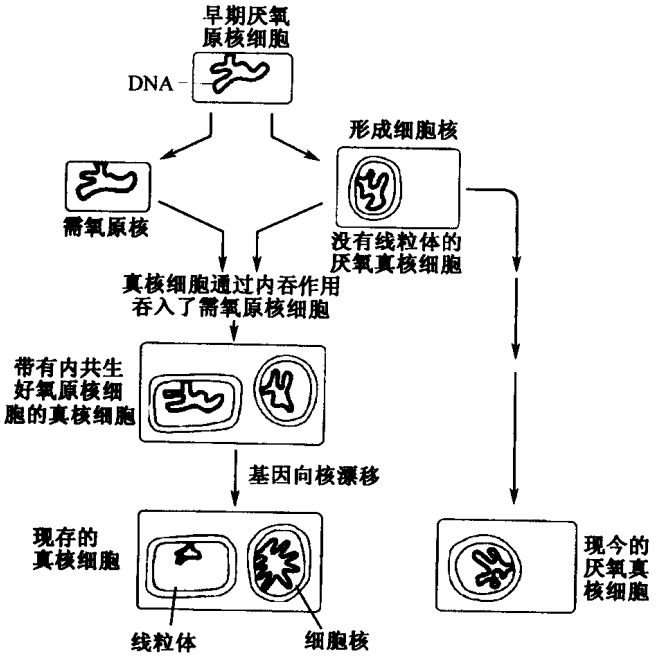


图7-42　线粒体的进化途径（引自 Alberts *et al.*, 1994）

粒体祖先原线粒体（一种可进行三羧酸循环和电子传递的革兰氏阴性菌）被原始真核生物吞噬后与宿主间形成共生关系。在共生关系中，对共生体和宿主都有好处：原线粒体可从宿主处获得更多的营养，而宿主可借用原线粒体具有的氧化分解功能获得更多的能量。

非内共生学说　又称细胞内分化学说。认为线粒体的发生是质膜内陷的结果。有几种模型，其中 Uzzell 的模型认为：在进化的最初阶段，原核细胞基因组进行复制，并不伴有细胞分裂，而是在基因组附近的质膜内陷形成双层膜，将分离的基因组包围在这些双层膜的结构中，从而形成结构相似的原始的细胞核和线粒体、叶绿体等细胞器。后来在进化的过程中，增强分化，核膜失去了呼吸和光合作用，线粒体成了细胞的呼吸器官。这一学说解释了核膜的演化渐进的过程。

7.6　过氧化物酶体

1954 年，在电子显微镜下检查肾小管时发现一种膜结合的颗粒（图 7-43），直径约为 0.5～1.0μm。由于不知道这种颗粒的功能，将它称为微体（microbody）。后来发现微体有两种类型：过氧化物酶体（peroxisome）和乙醛酸循环体（glyoxysome），后者只在植物中发现。

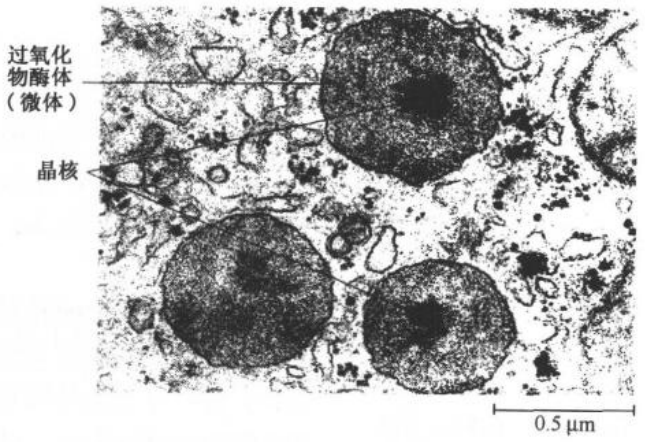


图 7-43　动物细胞中的过氧化物酶体（引自 Becker *et al*., 1996）
图示鼠肝细胞的过氧化物酶体的电子显微镜照片，每一个微体中有一个晶核，动物细胞微体中的晶核几乎都是尿酸氧化酶。

过氧化物酶体是由一层单位膜包裹的囊泡，通常比线粒体小。过氧化物酶体与溶酶体不同，它不是来自内质网和高尔基体，因此它不属于内膜系统的膜结合细胞器。过氧化物酶体普遍存在于真核生物的各类细胞中，但在肝细胞和肾细胞中数量特别多。过氧化物酶体的标志酶是过氧化氢酶，它的作用主要是将过氧化氢水解。H_2O_2 是氧化酶催化的氧化还原反应中产生的细胞毒性物质，氧化酶和过氧化氢酶都存在于过氧化物酶体中，从而对细胞起保护作用。

7.6.1 过氧化物酶体的发现及所含酶类

7.6.1.1 过氧化物酶体的发现

过氧化物酶体、溶酶体都是 de Duve 和他的同事发现的，发现的过程很简单，但是实验的设计却给我们以极大的启发。

de Duve 和他的同事通过梯度离心分离到溶酶体之后（溶酶体的分离将在第 9 章中讨论），通过对溶酶体酶的研究，发现至少有一种酶与溶酶体的酶性质不同：尿酸氧化酶不是酸性水解酶，尽管这种酶在离心分部时与溶酶体的酶相似。进一步研究发现在差速离心中，尿酸氧化酶与溶酶体的酶的沉降行为稍有不同。这些发现促使 de Duve 决心对该酶探个究竟，因为他猜测该酶有可能来自其他的细胞器。

通过等密度梯度离心技术，de Duve 等终于获得尿酸氧化酶是一种新细胞器的酶的线索。通过蔗糖密度梯度离心，发现尿酸氧化酶存在的密度区是 1.25g/cm^3，而线粒体和溶酶体分别是 1.19g/cm^3 和 1.20～1.24g/cm^3，由于密度差异太小，而溶酶体酶自身的密度范围又很宽，如何将尿酸氧化酶与溶酶体的酶分开？他们根据一次偶然的实验观察，设计了一个很好的方法：用一种去垢剂 Triton WR1339 注射小鼠，这种去垢剂在细胞内主要积累在溶酶体中，并使溶酶体的浮力密度降低到 1.1～1.14g/cm^3，这样就可以将尿酸氧化酶与溶酶体和线粒体分开。

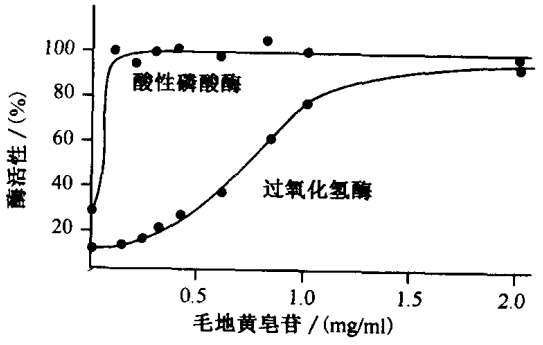


图 7-44 酸性磷酸酶和过氧化氢酶释放实验
（引自 Kleinsmith *et al.*, 1995）

离心后部分收集尿酸氧化酶样品，经分析，收集的尿酸氧化酶的样品中还含有过氧化物酶和 D-氨基酸氧化酶，后来发现的几种酶都与 H_2O_2 的形成和分解有关，由于新发现的细胞器与过氧化氢有关，故此命名为过氧化物酶体。

通过酸性磷酸酶和过氧化氢酶的释放实验也证明过氧化物酶体与溶酶体是两种不同的细胞器。首先分离能够释放酸性磷酸酶和过氧化氢酶的膜结合细胞器，然后用去垢剂（毛地黄皂苷）破坏细胞器使之释放酸性磷酸酶和过氧化氢酶。如果这两种酶定位于同一种细胞器中，那么只要该细胞器破裂就会同时释放出这两种酶，实验结果是要加 10 倍量的去垢剂才能释放过氧化氢酶（图 7-44），这就说明溶酶体和过氧化物酶体是两种不同的细胞器，两种细胞器的膜对去垢剂的耐受性是不同的。

7.6.1.2 过氧化物酶体的酶类

过氧化物酶体含有丰富的酶类，目前已知的有 40 余种，主要是氧化酶、过氧化氢酶和过氧化物酶（表 7-9）。

氧化酶（oxidase）　过氧化物酶体含有的氧化酶包括：尿酸氧化酶、D-氨基酸氧化酶、L-氨基酸氧化酶和 L-α-羟基酸氧化酶等。氧化酶约占过氧化物酶体酶总量的一半。各

种氧化酶作用于不同的底物，其共同特征是氧化底物的同时，将氧还原成过氧化氢。

$$RH_2 + O_2 \rightarrow R + H_2O_2$$

过氧化氢酶（catalase）　过氧化氢酶是过氧化物酶体的标志酶，这是因为所有过氧化物酶体都含有过氧化氢酶，约占过氧化物酶体酶总量的40%。过氧化氢酶的作用是使过氧化氢还原成水。

$$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$$

表 7-9　微体中发现的主要酶类

酶	鼠肝	植物种子	植物叶
过氧化氢酶	+	+	+
尿酸氧化酶	+	+	+
D-氨基酸氧化酶	+	+	−
L-氨基酸氧化酶	±	+	−
L-α-羟酸氧化酶	+	+	+
乙醇酸氧化酶	+	+	+
脂肪酸β-氧化酶	+	+	−
柠檬酸合成酶	−	+	−
顺乌头酸酶		+	−
异柠檬酸裂解酶	−	+	−
马来酸合成酶	−	+	−
马来酸脱氢酶	−	+	+
乙醛酸还原酶	+	−	+
乙醛酸转氨酶	−	−	+

注：+：存在，−：不存在；空白：未测。

7.6.2　过氧化物酶体的功能

因为氢的过氧化物是有毒的，似乎认为过氧化物酶体的功能就是防止产生过氧化氢，对细胞起保护作用。事实上，过氧化物酶体不仅仅是将过氧化氢水解，还有其他一些重要功能。

（1）*使毒性物质失活*　这种作用是过氧化氢酶利用过氧化氢氧化各种底物，如酚、甲酸、甲醛和乙醇等，氧化的结果使这些有毒性的物质变成无毒性的物质，同时也使 H_2O_2 进一步转变成无毒的 H_2O。这种解毒作用对于肝、肾特别重要，例如人们饮入的乙醇几乎有一半是以这种方式被氧化成乙醛的，从而解除了乙醇对细胞的毒性作用。

（2）*对氧浓度的调节作用*　过氧化物酶体中的氧化酶都是利用分子氧作为氧化剂，催化下面的化学反应：

$$RH_2 + O_2 \rightarrow R + H_2O_2$$

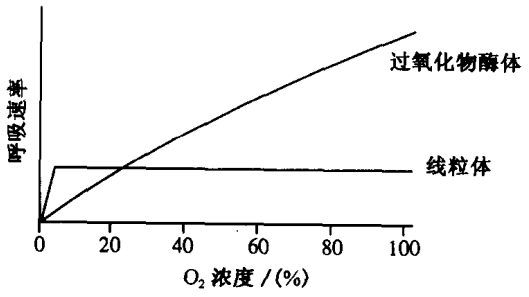


图 7-45　过氧化物酶体和线粒体中氧浓度与呼吸速率的关系（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

这一反应对细胞内氧的水平有很大的影响。例如在肝细胞中，有20%的氧是由过氧化物酶体消耗的，其余的在线粒体中消耗。在过氧化物酶体中氧化产生的能量以产热的方式消耗掉，而在线粒体中氧化产生的能量贮存在ATP中。线粒体与过氧化物酶体对氧的敏感性是不一样的，线粒体氧化所需的最佳氧浓度为2%左右，增加氧浓度，并不提高线粒体的氧化能力。过氧化物酶体与线粒体不同，它的氧化率是随氧张力增强而成正比地提高（图7-45）。因此，在低浓度氧的条件下，线粒体利用氧的能力比过氧化物酶体强，但在高浓度氧的情况下，过氧化物酶体的氧化反应占主导地位，这种特性使过氧化物酶体具有使细胞免受高浓度氧的毒性作用。

（3）*脂肪酸的氧化*　动物细胞的过氧化物酶体中有氧化脂肪酸的酶类。动物组织中大约有25%～50%的脂肪酸是在过氧化物酶体中氧化的，其他则是在线粒体中氧化的。另外，

由于过氧化物酶体中有与磷脂合成相关的酶，所以过氧化物酶体也参与脂的合成。

(4) 含氮物质的代谢　在大多数动物细胞中，尿酸氧化酶（urate oxidase）对于尿酸的氧化是必需的。尿酸是核苷酸和某些蛋白质降解代谢的产物，尿酸氧化酶可将这种代谢废物进一步氧化去除。另外，过氧化物酶体还参与其他的氮代谢，如转氨酶（aminotransferase）催化氨基的转移。

7.6.3　过氧化物酶体的生物发生

过氧化物酶体也像线粒体一样通过二裂法进行增殖（图 7-46），但是过氧化物酶体没有自己的 DNA 和核糖体，因此过氧化物酶体所有的酶和蛋白质都是由核基因编码并在细胞质中游离核糖体上合成，然后通过导向序列转运进来。构成过氧化物酶体的脂类都是由内质网合成并通过胞质溶胶中的磷脂交换蛋白转运而来。

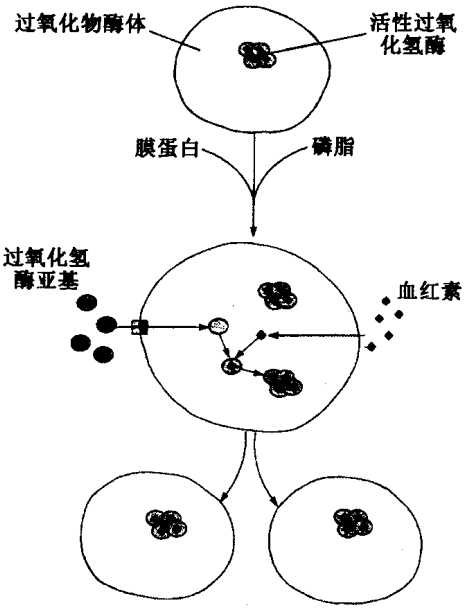


图 7-46　过氧化物酶体的生物发生（引自 Becker *et al*., 1996）

细胞中已存在的过氧化物酶体通过生长（从细胞质中摄取蛋白质和脂），然后再通过分裂形成新的过氧化物酶体。图的上部是刚刚产生的新的过氧化物酶体；中部是过氧化物酶体的生长，主要是通过蛋白质寻靶、扩散和脂交换蛋白等的作用将胞质溶胶中已存在的、过氧化物酶体所需的脂、蛋白质、酶及其他成分添加到新过氧化物酶体中；图的下部是重新分裂形成新的过氧化物酶体。

过氧化氢酶是研究得较为清楚的酶，它是一种含血红素的四聚体蛋白，在游离核糖体上先合成不含血红素的蛋白质单体，输入到过氧化物酶体后在血红素存在下装配成四聚体。已发现在过氧化物酶体酶蛋白的羧基端有一个三氨基酸序列 Ser-Lys-Leu-（SKL）起到转运肽的作用，如果将 SKL 序列连接到其他细胞质的蛋白质上，能够将该蛋白质引导到过氧化物酶体中。

提　要

线粒体是细胞内氧化磷酸化和形成 ATP 的主要场所，是细胞的“动力工厂”。

线粒体有内外两层膜，外膜含有孔蛋白，通透性高。内膜通透性较低，通常向基质折褶形成嵴，嵴上有许多规则排列的基粒。内膜上有许多参与运输、合成、电子传递和 ATP 合成的酶类。内外膜之间有膜间间隙，其化学组成接近胞质溶胶。线粒体基质中含有与三羧酸循环、线粒体 DNA 合成等相关酶类。

线粒体中绝大多数蛋白质由核基因编码，在细胞质游离核糖体上合成后通过转运肽运输到线粒体中，转运过程需要受体、消耗能量以及分子伴侣的帮助等。

线粒体是真核生物氧化代谢的部位。糖酵解生成的丙酮酸进入线粒体基质，经过三羧酸循环生成 $FADH_2$ 和 NADH，再进入呼吸链进行氧化磷酸化，最后生成 ATP 和水。呼吸链上的电子载体有黄素蛋白、细胞色素、铁硫蛋白和辅酶 Q。主呼吸链由复合物 I、III、IV 构成，传递氧化 NADH 释放的电子，次呼吸链由复合物 II、III、IV 构成，传递氧化 $FADH_2$ 释放的电子。呼吸链通过 3 个氧化磷酸化偶联位点即复合物 I、III、IV 建立质子动力势，驱动 ATP 合酶合成 ATP。英国生化学家 Mitchell 于 1961 年提出化学渗透假说，合理解释了线粒体氧化磷酸化的机制。

线粒体是一种半自主性的细胞器，具有有限的遗传物质以及蛋白质合成系统等。线粒体通过二裂法进行增殖。关于线粒体的起源有内共生学说和非内共生学说两种假说。

过氧化物酶体是由一层单位膜包裹的囊泡，含 40 余种酶类，主要是氧化酶、过氧化氢酶和过氧化物酶。过氧化物酶体具有解毒、调节氧浓度、氧化脂肪酸、进行含氮物质代谢等功能。过氧化物酶体也是通过二裂法进行增殖，其酶类和蛋白质均为核基因编码并于细胞质游离核糖体上合成后转运而来。

8 叶绿体与光合作用

根据生物能否进行光合作用，分为两种类型：能够进行光合作用的称为自养生物（autotroph），不能进行光合作用的称为异养生物（heterotroph）。异养生物只能从消耗的含碳食物中获得还原型的碳素营养。

概括地说，光合作用就是自养生物利用光能将碳进行还原的过程。在真核自养生物中，捕获光能的反应只能发生在特殊的细胞器——叶绿体中。而在原核自养生物中，相应的反应发生在质膜上。植物通过光合作用将光能转变成化学能的过程主要是在植物细胞的叶绿体中进行的，叶绿体（chloroplast）是植物细胞所特有的能量转换细胞器（图 8-1），其功能是进行光合作用，即利用光能同化二氧化碳和水，合成糖，同时产生分子氧。

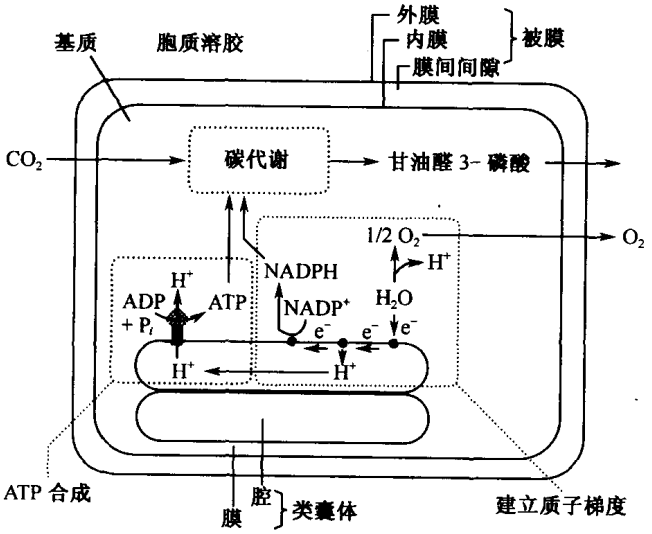


图 8-1 叶绿体的结构域功能全览（引自 Alberts *et al.*, 1998）

8.1 叶绿体的来源与分布

由于叶绿体的体积大且具有绿色，所以它是光学显微镜下发现的第一个细胞内的结构。17 世纪光学显微镜发明不久，列文虎克就在藻类中观察到叶绿体，到了 1800 年，在各种植物的叶中鉴定到叶绿体。将叶绿体置于低渗溶液中会膨胀破裂，表明叶绿体也是由半透性的膜包裹的细胞器。

8.1.1 叶绿体与质体

虽然叶绿体是植物细胞特有的细胞器，但并非所有的植物细胞都具有叶绿体。高等植物

中的分生组织细胞就缺少叶绿体，但是它们具有一些小的细胞器，称为前质体（proplastid）。前质体的直径约为1μm，或更小一些，它是由双层膜包被着未分化的基质（stroma）所组成。植物中的前质体随着在发育过程中所处的位置以及接受光的多少程度，分化成功能各异的质体（plastid）。所以，质体是植物细胞中一类膜结合细胞器的总称，这类细胞器都是由共同的前体：前质体分化发育而来（图8-2）。

根据质体是否含有叶绿素和功能的不同，除了叶绿体之外，质体还包括白色体、有色体、蛋白质体、油质体、淀粉质体等。

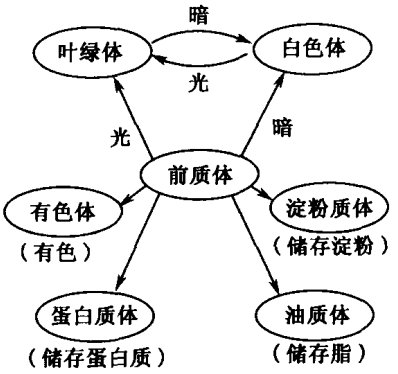


图8-2 前质体分化途径
（引自 Kleinsmith *et al.*, 1995）

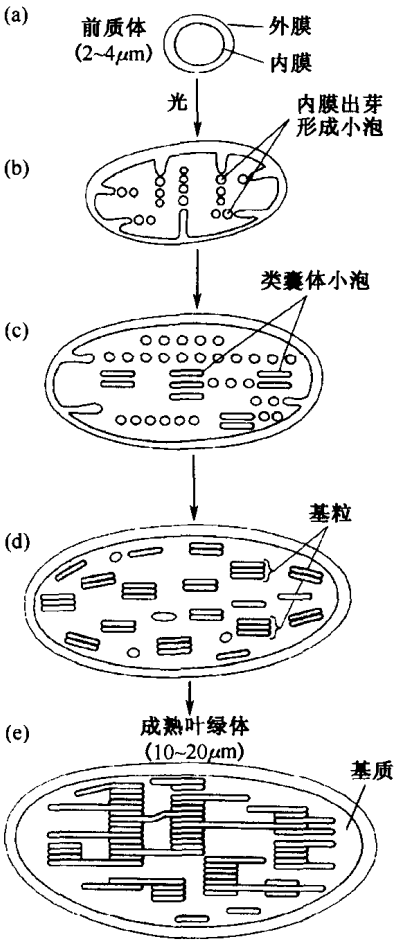


图8-3 光诱导前质体分化成叶绿体的过程
（引自 Lodish *et al.*, 1995）
（a）黑暗条件下的前质体只含有叶绿体的内膜和外膜；（b）光触发叶绿素、磷脂、叶绿体基质蛋白和类囊体蛋白的合成，然后从叶绿体内膜出芽形成小泡；（c）前质体变大，某些球形的小泡融合，最后形成连成一体的扁平的类囊体小泡，某些类囊体小泡堆积起来并在光诱导下大量合成LHC蛋白；（d，e）叶绿体进一步变大，当更多的类囊体小泡形成基粒时，叶绿体成熟。

8.1.1.1 白色体

白色体（etioplast）是质体的一种，不含色素，多存在于植物的分生组织和储藏组织中，具有制造和储藏淀粉、蛋白质和油脂的功能。这类质体是由于前质体在发育分化过程中一直处于黑暗中，发育的顺序发生了改变，使内部的膜结构形成了片层体。如果将发育成熟的具有叶绿体的绿色植物置于黑暗中，叶绿体也会转变成白色体。原因是叶绿体的类囊体的膜会破裂并互相融合形成典型的片层体结构，叶绿体就变成了白色体。

8.1.1.2 有色体

有色体（chromoplast）含有类胡萝卜素，不含叶绿素，无类囊体结构。分布于高等植物的某些器官，如花瓣、果实和根细胞中，使其呈现黄色或橘黄色。不进行光合作用，功能是富集淀粉和脂类。另外还有储存蛋白质的质体、储存淀粉的质体、储存脂的质体等。各种类型的质体之间，在发育上有密切联系，在不同时期和不同组织中，可相互转变。

8.1.1.3 光诱导前质体分化成叶绿体

与其他质体不同，叶绿体是惟一含有

类囊体膜结构的质体，是前质体在光照条件下诱导发育而来。前质体仅由内膜和外膜构成，膜内是少量的基质和 DNA，但是没有 LHC 蛋白、叶绿素和电子传递系统。在光的诱导下，激发了叶绿体蛋白的合成，并跨过前质体的内膜运输到前质体内。同时内膜向内出芽形成膜泡，这些膜泡能够自我成堆排列，通过摄取必要的蛋白质和叶绿素，最后形成成熟的类囊体泡（图 8-3）。

8.1.2 叶绿体的形态大小、数量和分布

8.1.2.1 形态大小

高等植物中的叶绿体为球形、椭圆形或卵圆形，为双凹面。有些叶绿体呈棒状，中央区较细小而两端膨大（图 8-4），充满叶绿素和淀粉粒。在同一物种的不同细胞内叶绿体的形态变化较大，但在同一种组织的细胞内比较稳定。叶绿体的大小变化很大，高等植物叶绿体通常宽为 2～5μm，长 5～10 μm。对于特定的细胞类型来说，叶绿体的大小相对稳定，但受遗传和环境的影响。例如多倍体细胞内的叶绿体就比单倍体细胞的要大些。同一种植物生长在不同的环境中，其大小也不相同。

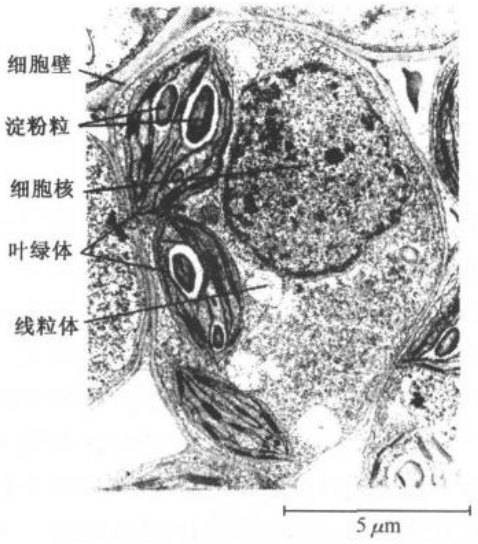


图 8-4 植物叶细胞中的叶绿体
（引自 Becker *et al*., 1996）

8.1.2.2 数量和分布

不同植物中叶绿体的数目相对稳定，大多数高等植物的叶肉细胞含有几十到几百个叶绿体，可占细胞质体积的 40%。叶绿体的数目因物种、细胞类型和生理状况而异，藻类植物通常只有一个巨大的叶绿体，其形态有螺旋状、星状，依据细胞的形态而定。如丝状绿藻含有一个螺旋带型的巨大叶绿体，而紫球藻细胞中含有一个巨大的球形叶绿体，其内膜小泡平行排列而不堆积形成基粒。

叶绿体在细胞质中的分布有时是很均匀的，但有时也常集聚在核的附近，或者靠近细胞壁。叶绿体在细胞内的分布和排列因光能的不同而有所变化。叶绿体可随植物细胞的胞质环流而改变位置和形状。

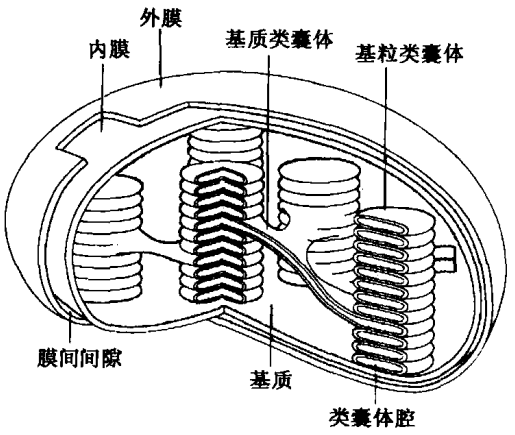


图 8-5 叶绿体的膜与区室（引自 Wolfe，1993）

8.2 叶绿体的结构与化学组成

叶绿体是由叶绿体膜（chloroplast

membrane 或称之为外被 out envelope)、类囊体（thylakoid）和基质组成（图 8-5)。叶绿体的结构比较特殊，它含有 3 种不同的膜（外膜、内膜和类囊体膜）以及 3 种彼此分隔的区室(膜间间隙、叶绿体基质和类囊体腔)。

8.2.1 叶绿体被膜的结构及特性

叶绿体是由外膜、内膜和类囊体膜等 3 种不同类型的膜将其内部分隔成 3 个不同的区室：膜间间隙、叶绿体基质和类囊体腔。因此，叶绿体是一种特别的膜结合细胞器。

8.2.1.1 叶绿体膜的结构与化学组成

叶绿体的外膜和内膜合称为被膜（envelope)。叶绿体的外膜和内膜都是连续的单位膜，每层膜的厚度为 6～8nm，内外两膜间有 10～20nm 宽的间隙，称为膜间间隙。与线粒体不同的是，叶绿体的内膜并不向内折成嵴，但在某些植物中，内膜可皱褶形成相互连接的泡状或管状结构，称为周质网（peripheral reticulum)，这种结构的形成可增加内膜的表面积。

通过对分离的叶绿体膜进行的化学分析，发现内膜的蛋白质与脂的比值比外膜高（表 8-1),其原因是内膜含有较多的膜整合蛋白。

表 8-1 菠菜叶绿体膜的脂含量

脂	总脂的百分数		
	外膜	内膜	类囊体膜
糖脂			
单半乳糖二乙酰甘油	17	55	40
二半乳糖二乙酰甘油	29	29	19
硫醌二乙酰甘油	6	5	5
磷脂			
磷脂酰甘油	10	9	5
磷脂酰胆碱	32	0	0
磷脂酰肌醇	5	1	1
光吸收色素			
叶绿素	0	0	20
类胡萝卜素	<1	<1	6
醌	0	0	3
蛋白质/脂的比值	0.35	0.9	1.5

内膜上的蛋白质大多是与糖脂、磷脂合成有关的酶类。研究结果表明叶绿体的被膜不仅是叶绿体脂合成的场所，也是整个植物细胞的脂合成的主要场所。这一点与动物细胞有很大的不同；在动物细胞中，脂类的合成主要是在光面内质网上进行的。内膜中发现的另一类蛋白质是膜运输蛋白，这也同线粒体一样，由于外膜通透性大，物质的选择性运输任务就自然压在了内膜上。

膜间间隙将叶绿体的内外膜分开，间隔约为 2～10nm。由于外膜的通透性大，所以膜间间隙的成分几乎同胞质溶胶的一样。尚不了解在膜间间隙中有哪些蛋白质的存在。

8.2.1.2 叶绿体被膜的通透性与内膜转运蛋白

曾将叶绿体置于不同溶质的溶液中，然后测定叶绿体对这些物质吸收的量来研究叶绿体被膜的通透性，发现大多数小分子物质都能很快进入叶绿体，但是在叶绿体中的最终浓度都是要比叶绿体膜间间隙中的浓度低。造成这种结果的原因与线粒体对蔗糖的吸收一样，内膜和外膜的通透性不同。

叶绿体外膜上也有孔蛋白的存在，不过与线粒体外膜中的孔蛋白稍有不同，叶绿体孔蛋白的孔径要大一些，最大可允许分子质量在 10 000～13 000 道尔顿的分子通过。由于胞质溶胶中的大多数分子都能通过孔蛋白，所以叶绿体膜间间隙的环境与细胞质中的环境相差无几。

叶绿体内膜的通透性较差，是叶绿体的界膜。除了叶绿体功能必需的 3 种分子，即氧、水和二氧化碳能自由通过内膜外，其他都不能自由通过。在叶绿体内膜上有很多运输蛋白，它们的功能是选择性转运出入叶绿体的分子。叶绿体内膜上所有转运蛋白的运输作用都是靠浓度梯度驱动的，而不是主动运输。这不仅与细胞质膜的运输蛋白不同，也与线粒体内膜的运输系统不同，在线粒体内膜中也有主动运输的转运蛋白。

叶绿体运输蛋白的一个重要运输机制是通过交换进行的，如磷酸交换载体（phosphate exchange carrier），通过交换可同时运输 P_i 和磷酸甘油醛（phosphoglyceraldehyde，PGAL）（图 8-6）。叶绿体的光合作用需要大量的无机磷，并且有大量的中间产物 3-磷酸甘油醛释放。在叶绿体内膜中有磷酸交换载体能够通过交换将细胞质中的无机 P_i 转运到叶绿体基质，并将叶绿体基质中产生的 PGAL 释放到细胞质。磷酸交换载体是叶绿体内膜中最为丰富的蛋白质，约占内膜总蛋白的 12%。

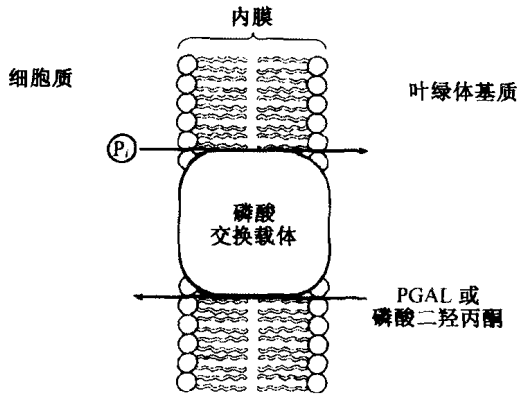


图 8-6 叶绿体内膜中 P_i-PGAL 转运蛋白
（改自 Wolfe，1993）
磷酸交换转运蛋白，它通过交换的形式将无机磷（P_i）运入叶绿体，而将 PGAL 转运到胞质溶胶中。

叶绿体内膜中另一个重要的运输蛋白是二羧酸交换载体（dicarboxylate exchange carrier）。这种蛋白能够交换含有两个羧基的酸，如苹果酸（malate）、琥珀酸（succinate）、草酰乙酸（oxaloacetate）、延胡索酸（fumarate）、谷氨酸和天冬氨酸等，并且也是一对一的交换，即从叶绿体基质中输出一个二羧酸，同时从细胞质中输入一个二

羧酸。这种运输蛋白的主要功能是参与各种穿梭活动。叶绿体基质和细胞质间 NADP 的电子传递就是靠这种穿梭作用进行的，主要是将叶绿体基质中的苹果酸和细胞质中的延胡索酸进行交换，将叶绿体膜两侧的反应结合起来就形成了 NADP 的氧化和还原的反应对（图 8-7）。苹果酸/延胡索酸的穿梭运输表明，叶绿体内膜像线粒体一样，对于 NAD 和 NADP 无论是氧化型还是还原型都是不能渗透的。

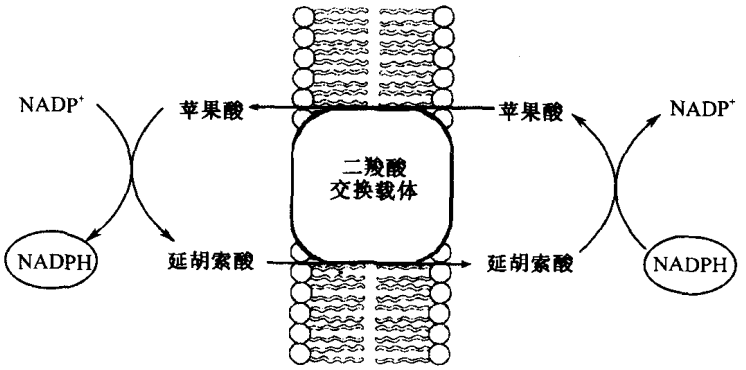


图 8-7　叶绿体内膜中苹果酸/延胡索酸穿梭运输蛋白（改自 Wolfe，1993）

苹果酸/延胡索酸穿梭运输蛋白是典型的二羧酸交换载体。通过穿梭交换含有两个羧基的不同有机酸，并且是一对一的交换。交换的结果是将叶绿体基质 NADPH 中的高能电子转运到细胞质 $NADP^+$ 中。

叶绿体内膜中还有其他一些转运载体和穿梭载体。如光合作用的产物葡萄糖可通过内膜中葡萄糖载体（glucose carrier）运输到细胞质中。由于内膜中葡萄糖载体的活性不高，只能少量运输葡萄糖。内膜中一些常见的运输蛋白及功能列于表 8-2。

表 8-2　叶绿体内膜中的运输系统

载体	功能
ADP/ATP 交换载体	进行细胞质和叶绿体基质间的 ADP/ATP 交换
二羧酸交换载体	进行细胞质和叶绿体基质间二羧酸的交换
葡萄糖载体	将叶绿体基质中的葡萄糖运输到胞质溶胶
乙醇酸载体	将叶绿体基质中的乙醇酸运输到胞质溶胶
磷酸交换载体	将细胞质中的无机磷与叶绿体基质中的三碳糖进行交换

8.2.2　类　囊　体

与线粒体不同，叶绿体基质中有第三种膜结构系统，称为类囊体（thylakoid），由内膜发展而来的膜封闭的扁平小囊。它是叶绿体内部组织的基本结构单位，上面分布着许多光合作用色素，是光合作用的光反应场所。

8.2.2.1 类囊体的结构

叶绿体中的类囊体有两种类型：基粒类囊体（granum thylakoid）和基质类囊体（stroma thylakoid）（图 8-8）。

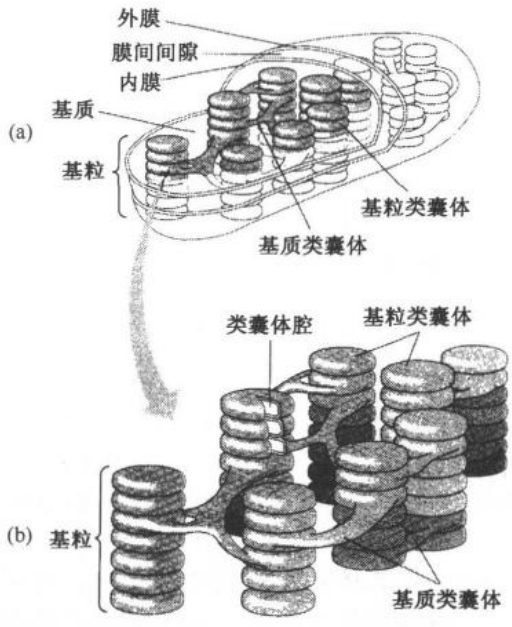


图 8-8 基粒和基质类囊体立体结构（引自 Becker *et al*., 1996）

(a) 切开的叶绿体模式图；(b) 两种类型的类囊体模式图。

叶绿体中圆盘状的类囊体常常相互堆积在一起形成柱形颗粒，叫基粒（granum），看起来似一叠硬币。每一个叶绿体中约含有 40～80 个基粒。将构成基粒的类囊体称为基粒类囊体，或称为堆积类囊体（stacked thylakoid）。基粒类囊体的直径为 0.25～0.8μm；厚 0.01μm，一个基粒是由 5～30 个基粒类囊体所组成，最多的可达上百个。

通常基粒中的类囊体会延伸出网状或片层结构并与相邻的基粒类囊体相通，连接两个相邻基粒类囊体的片层结构称为基质片层（stroma lumen）或基质类囊体，也有称为非堆积类囊体（unstacked thylakoid）。基质类囊体是非常大的扁平囊泡结构，能够将多个甚至所有的单个基粒类囊体连接起来。

基本上，所有参与光合作用的色素、光合作用所需的酶类、参与电子传递的载体以及将电子传递与质子泵和 ATP 合成偶联的蛋白质都定位在类囊体膜上。

由类囊体膜封闭的区室称为类囊体腔（thylakoid lumen），类囊体腔与叶绿体基质是分隔的，它在电化学梯度的建立和 ATP 的合成中起重要作用。

8.2.2.2 类囊体膜的化学组成

类囊体的膜在两个方面表现出独特的性质：类囊体膜上有伸向基质的柄状结构，称为

CF_1 颗粒；第二个特性是相互堆积形成基粒。类囊体膜的化学组成也比较特别，如细胞质膜中的主要脂类成分磷脂在类囊体膜上只占 5%～20%，而在线粒体的膜上磷脂占有 90% 的量，内质网膜上的磷脂也有 80%。类囊体膜上的脂主要是含半乳糖的一些糖脂和具有光吸收功能的脂类色素。脂类中的脂肪酸主要是不饱和的亚麻酸，约占 87%，因此，类囊体膜的脂双层流动性特别大。此外，类囊体膜上的蛋白质与脂的比值很高（表 8-1），这是因为类囊体膜有许多电子载体、酶和一些参与光合作用的色素结合蛋白。

类囊体的蛋白分为内在蛋白和外周蛋白两类。外周蛋白在类囊体膜的叶绿体基质面的较多；内在蛋白镶嵌在脂双层中，如质体蓝素、细胞色素等。

8.2.2.3 叶绿体基质

叶绿体内膜与类囊体之间的区室，称为叶绿体基质。在电子显微镜下观察可见到基质中有一些细微颗粒，其中最多的是淀粉颗粒。这种颗粒是用于储存光合作用所产生的糖。另外还有一些含脂的沉积物称为质体球（plastoglobule），这种小球的产生同类囊体的破裂有关，当新类囊体形成时，老的类囊体破裂，可减少类囊体的数量和体积，由此可以推测质体可作为类囊体脂的储备库。基质中含有大量的可溶性蛋白，其中 RuBP 羧化酶占可溶性蛋白总量的 60%。此外，基质中还含有 CO_2 固定反应的所有酶类。叶绿体基质中还有核糖体、DNA 和 RNA 等。叶绿体的 DNA 大约编码 100 种多肽，涉及叶绿体 DNA 的复制、转录和翻译。基质是光合作用固定 CO_2 的场所。

8.2.3 叶绿体蛋白的定位

构成叶绿体的蛋白质，大约有 90% 是由核基因编码的，10% 是叶绿体 DNA 编码的。所有叶绿体 DNA 编码的蛋白质都是在叶绿体基质中合成后再运送到目的地。而核基因编码的蛋白质则是在细胞质中合成后，通过与线粒体蛋白类似的转运方式运入叶绿体。

8.2.3.1 叶绿体基质蛋白的转运

核酮糖 1，5-二磷酸羧化酶加氧酶（ribulose-1，5-bisphosphate carboxylase-oxygenase，rubisco）是叶绿体基质中进行 CO_2 固定的重要酶类，分子质量为 550 kDa，总共有 16 个亚基，其中 8 个大亚基（每个分子质量为 55kDa）含有催化位点，8 个小亚基（每个分子质量 12 kDa）是全酶活性所必需的。rubisco 的大亚基由叶绿体基因编码，而小亚基则由核基因编码，在细胞质的游离核糖体上合成后被运送到叶绿体基质中（图 8-9）。

离体实验表明，小亚基前体蛋白的 N 端有一段导向序列，长为 44 个氨基酸残基，运输过程也需要分子伴侣 Hsp70 的参与，运输到叶绿体基质后，转运肽要被切除，最后 8 个小亚基与叶绿体基因编码的 8 个大亚基结合形成全酶。

8.2.3.2 类囊体蛋白的定位

类囊体蛋白包括类囊体膜蛋白和类囊体腔蛋白。定位于类囊体膜或腔的蛋白质除了要有叶绿体基质导向序列外，还须有插入类囊体膜或跨过类囊体膜的导向序列。

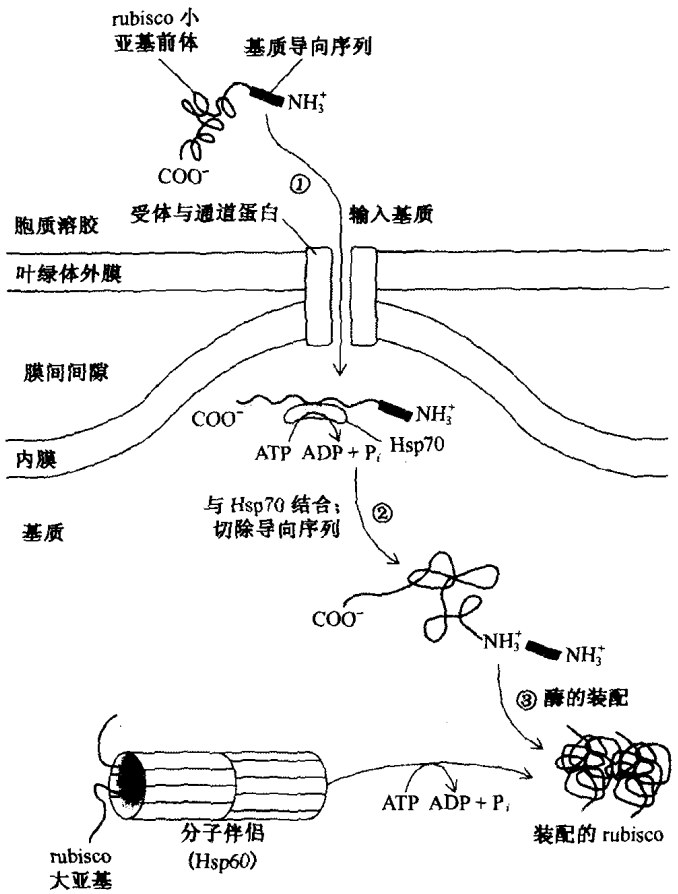


图 8-9　rubisco 小亚基的运输及全酶的装配（引自 Lodish *et al*., 1995）

在细胞质的游离核糖体中合成的 rubisco 小亚基的 N 端具有一段叶绿体基质导向序列，通过导向序列与叶绿体外膜的受体结合，然后通过运输通道进入叶绿体基质，在叶绿体基质分子伴侣 Hsp 的帮助下，切除导向序列。

类囊体蛋白的转运需要两个引导肽，进入叶绿体基质后切除一个，另一个引导肽进入类囊体。已知有 4 种转运方式，图 8-10 给出了两种，其中质体蓝素（plastocyanin，PC）一直保持非折叠状态，直到进入类囊体腔。而金属结合蛋白（metal-binding protein）进入叶绿体基质后要进行折叠，然后以折叠的方式进入类囊体腔。

8.2.4　叶绿体组分的分离

为了更好地研究和了解叶绿体的结构和功能，分离叶绿体的各个结构组分是必要的。已经发展了几种方法从植物细胞中分离叶绿体及其各部分结构（图 8-11）。

有些分离方法使用了剧烈的匀浆技术，例如通过研磨破坏细胞壁让叶绿体释放到溶液中，然后通过差速离心分离叶绿体。也可用纤维素酶或果胶酶水解细胞壁获得原生质体，再用温和的方法破坏细胞质膜，然后通过离心分离叶绿体。

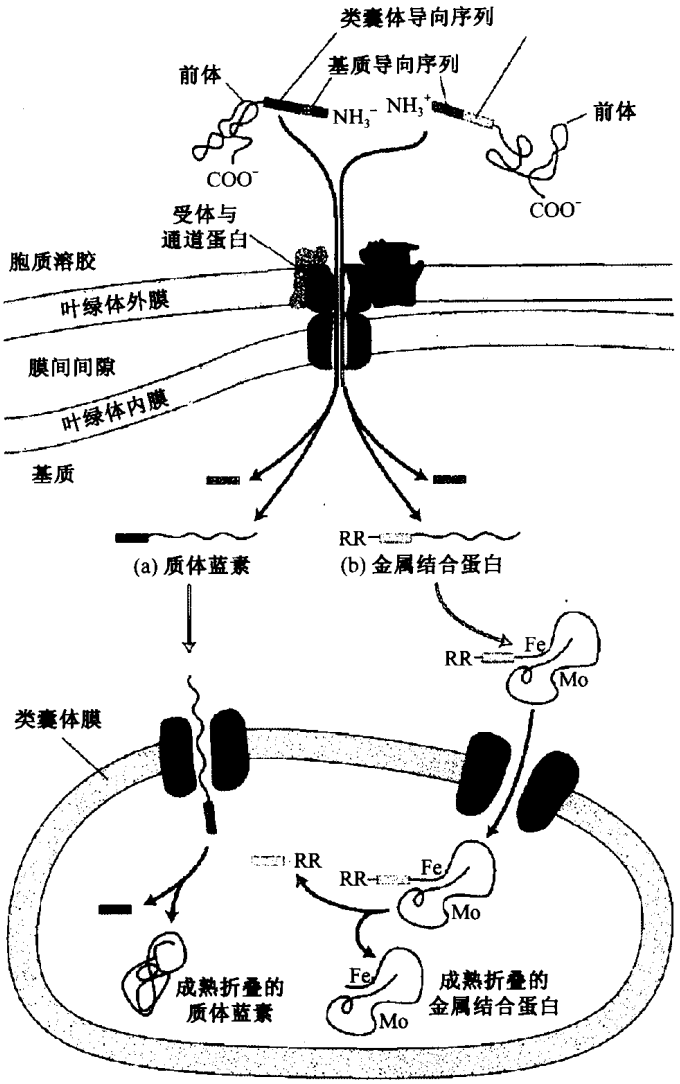


图 8-10　类囊体腔中质体蓝素和金属结合蛋白的定位（引自 Lodish *et al*., 1995）

用剧烈方法分离的叶绿体能够在光诱导下产生氧、ATP、NADPH，但是不能固定 CO_2。在电子显微镜下观察这种有缺陷的叶绿体，发现它含有很少或者根本没有叶绿体基质，并且叶绿体外被是破损的或者没有外被，将这种叶绿体称为 II 类叶绿体。

相比之下，用温和方法分离的叶绿体具有完整的被膜，将它称为 I 类叶绿体，它能够完成整个光合作用，包括 CO_2 的固定。

可以用 I 类或 II 类叶绿体作为分离叶绿体各组分的出发材料，常用 I 类叶绿体分离叶绿体的亚组分。将叶绿体悬浮在低渗溶液中，破裂被膜，接着用等密度离心分离叶绿体基质、被膜、类囊体。如果用 II 类叶绿体作为分离叶绿体亚组分的出发材料，需要细胞压碎器，分离到组成叶绿体的亚组分之后，便可对这些组分的化学组成和功能进行分析。

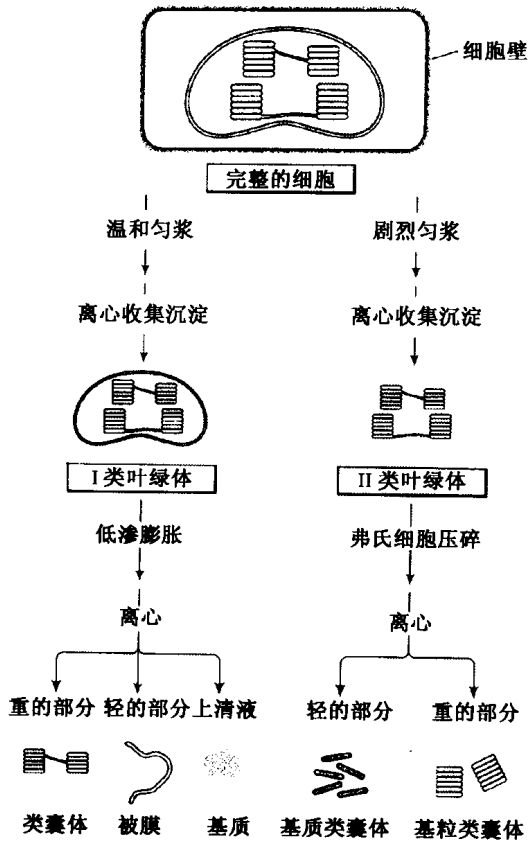


图 8-11　分离叶绿体及其组分的过程（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

用温和匀浆技术分离 I 类叶绿体，这种类型的叶绿体保留完整的被膜。然后在低渗条件下破坏叶绿体，使叶绿体的膜、叶绿体基质、类囊体相互分开。用剧烈的匀浆技术制备 II 类叶绿体，这种叶绿体实际上只是类囊体，然后用弗氏压碎器将堆积的类囊体与非堆积类囊体分开。

8.3　光合作用的光反应

叶绿体的主要功能是进行光合作用（photosynthesis），它是绿色植物利用叶绿素吸收光能、然后固定 CO_2，并与 H_2O 同化成有机物，同时释放出氧的反应过程。

8.3.1　光合作用概述

18 世纪末就已经知道光合作用能够将水和 CO_2 转变成有机物和氧，并很快确定了光合作用的反应式：$6CO_2 + 6H_2O +$ 光$\rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6O_2 +$ 化学能（674000 千卡）。

早在 1905 年，Blackman 就提出光合作用可分为两个不同的阶段，即光反应和暗反应（light and dark reaction）。光反应是对光的吸收，并产生氧；暗反应涉及到 CO_2 的固定。

光反应与暗反应之间有什么联系？1951 年首次发现了一个线索，即是叶绿体在光合作用中将 $NADP^+$ 还原成 NADPH。几年之后，发现叶绿体能够合成 ATP。因为 ATP 和 NADPH

都是高能化合物，所以有理由推测它们在光合作用中的作用是将光合作用的能量转移给暗反应。为了验证这种想法，有人将 ATP 和 NADPH 添加到含有暗反应所需酶的可溶性叶绿体提取物中，结果能够刺激 CO_2 的固定。也就是说，暗反应需要 NADPH 或 ATP。

图 8-12 显示了光合作用的光反应和暗反应的相互关系。光反应又称为光合电子转移反应（photosythenic electron-transfer reaction）。在反应过程中，来自于太阳的光能使绿色生物的叶绿素产生高能电子，从而将光能转变为电能；同时，叶绿素从水光解中获得电子，并将 H^+ 质子从叶绿体基质传递到类囊体腔，建立电化学质子梯度。光反应的最后一步是高能电子经电子传递链转移给 $NADP^+$，使其被还原成 NADPH。光反应的场所是类囊体。概括地说光反应是通过叶绿素等光合色素分子吸收光能，并将光能转化为化学能，形成 ATP 和 NADPH 的过程。光反应包括光能吸收、电子传递、光合磷酸化 3 个主要步骤。

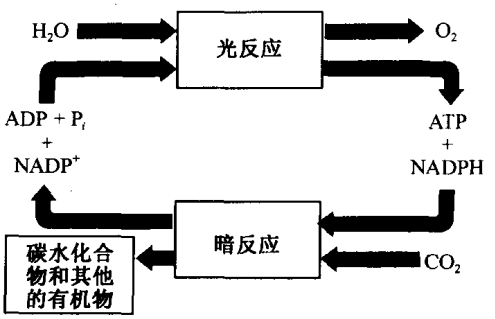


图 8-12　光反应与暗反应间的关系

光合作用的最终目的是固定 CO_2，并将之转变为糖，这就是暗反应，实际上是 CO_2 固定反应，简称碳固定反应（carbon-fixation reaction）。在这一反应中，叶绿体利用光反应产生的 ATP 和 NADPH 这两个高能化合物分别作为能源和还原的动力将 CO_2 固定，使之转变成葡萄糖，由于这一过程不需要光所以称为暗反应。碳固定反应开始于叶绿体基质，结束于细胞质基质。

光合作用利用光能和动物释放的废气 CO_2 合成糖作为其他反应的能源和结构分子，光合作用释放的 O_2 则是好氧生物生存的基本条件。据估计，地球上的植物每年将 6×10^{14}kg 的 CO_2 转变成糖，同时释放 4×10^{14}kg 的 O_2。

8.3.2 光 吸 收

光吸收是光化学反应的第一步，主要是固定光子（photon），它是光线中携带能量的粒子。一个光子能量的多少与波长相关，波长越短，能量越高。当一个光子被分子吸收时，就有一个电子获得足够的能量并从内轨道跃迁到外轨道，具有电子跃迁的分子就从基态（ground state）变成了激发态（exited state）。激发态的分子是不稳定的，推测只能维持 10^{-9} s。这样，由于环境的不同，激发的电子会有几种不同的结果。以叶绿素为例，如果激发态的叶绿素分子的电子又回到低能轨道，它就必须释放所吸收的能量。如果能量是以热或光（荧光）的形式被释放，叶绿素分子就会恢复到原始的基态，那么吸收光子的能量就没有被利用。实际上，叶绿素分子由激发态变为基态时，它的高能电子并没有回落到低能轨道，而是在叶绿素分子回落到基态之前被传递给了受体，时间约为 10^{-12}s。这实际上将吸收的光子的光能转变成了电能。

所以光吸收是光反应的最初始的反应，又称原初反应，指叶绿素分子从被光激发至引起第一个光化学反应为止的过程，包括光能的吸收、传递和转换，即光能被聚光色素分子吸收，

并传递至作用中心，在作用中心发生最初的光化学反应，使电荷分离从而将光能转化为电能的过程。

8.3.2.1 光合作用色素

色素（pigment）是含有特定化学基团的分子，这些化学基团能够吸收可见光谱中特定波长的光。能够吸收光的色素称为捕光色素（light-harvesting pigment）或光吸收色素（light-absorbing pigment），此类色素位于类囊体的膜上，只具有吸收聚集光能的作用，而无光化学活性，故此又称为天线色素。

植物中进行光合作用的主要色素是叶绿素（chlorophyll，图 8-13），它是一类含脂的色素家族，位于类囊体膜，并且赋予植物的绿色。叶绿素吸收的光主要是蓝色和红色而不是绿色

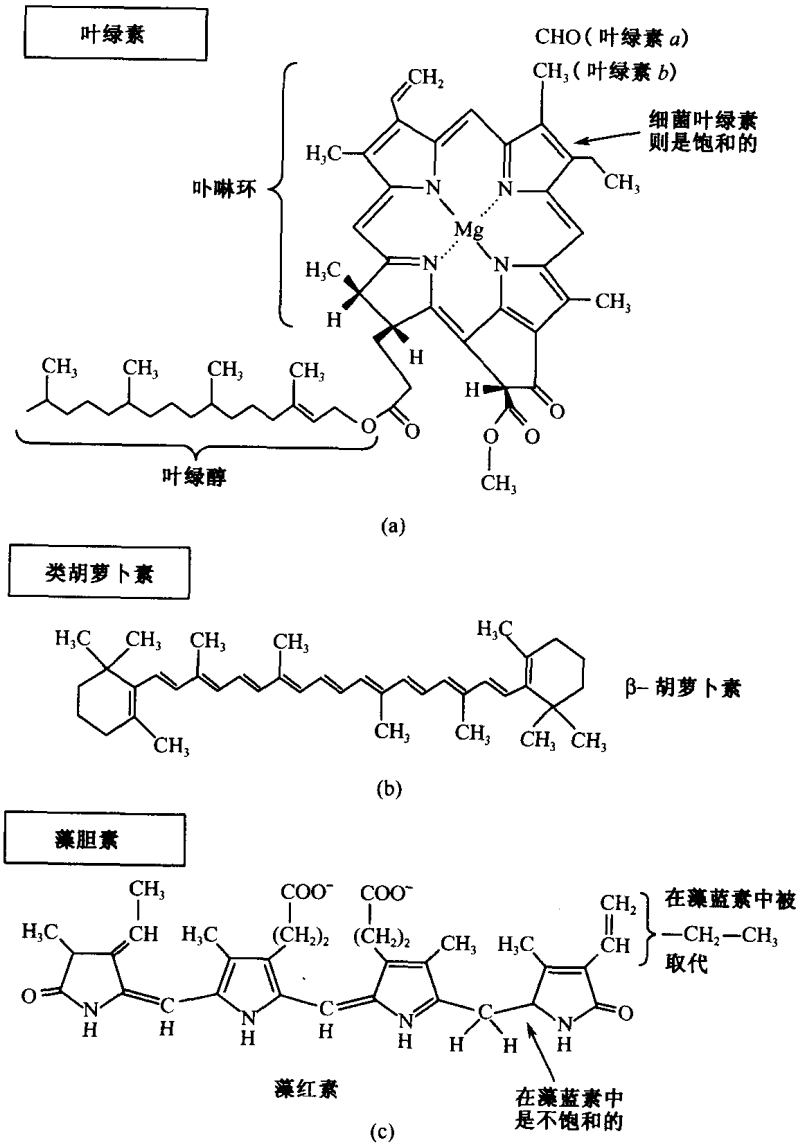


图 8-13 几种主要的光合作用色素的结构

光，它在光合作用的光吸收中起核心作用。

叶绿素分子（图 8-13a）是由两部分组成的：核心部分是一个卟啉环（porphyrin ring），其功能是光吸收；另一部分是一个很长的脂肪烃侧链，称为叶绿醇（phytol），叶绿素用这种侧链插入到类囊体膜。与含铁的血红素基团不同的是，叶绿素卟啉环中含有一个镁原子。叶绿素分子通过卟啉环中单键和双键的改变来吸收可见光。

植物含有几种类型的叶绿素，它们之间的差别在于烃侧链的不同。叶绿素 *a* 存在于能进行光合作用的真核生物和蓝细菌中。大多数能进行光合作用的细胞还有第二种类型的叶绿素，即叶绿素 *b* 或叶绿素 *c*。在高等植物和绿藻的细胞中含有叶绿素 *b*，而在其他一些类型的细胞中含有叶绿素 *c*。不同类型的叶绿素对光的吸收也是不同的，如叶绿素 *a* 最大的吸收光的波长在 420～663nm，叶绿素 *b* 的最大吸收波长范围在 460～645nm。当叶绿素分子位于叶绿体膜上时，由于叶绿素与膜蛋白的相互作用，会使光吸收的特性稍有改变。

除了叶绿素之外，类囊体还含有其他一些相关色素，帮助叶绿素提高对光吸收的效率，这类色素主要是类胡萝卜素（carotenoid，图 6-13b），也是一个含脂的分子家族，类胡萝卜素吸收紫色和蓝色光（400～500nm）。另一类帮助叶绿素进行光吸收的色素是藻胆素（phycobillin，图 8-13c），存在于红藻和蓝细菌中。这些色素分子之所以能够帮助叶绿素提高光的吸收，主要是吸收了一些叶绿素不能吸收的杂色光，起了过滤作用（图 8-14）。同时，这些色素吸收的光能也能转移给叶绿素，同叶绿素分子吸收的光能一起进入光合作用途径。

8.3.2.2 光合作用单位和反应中心

在光合作用中，叶绿素分子除了同相关色素相互作用外，叶绿素分子之间也要相互作用，这一结论是 Emerson 和 Arnold 1932 年通过实验得出的。

实验中发现叶绿体在光合作用中，每固定 1 个 CO_2 分子（或者说每释放 1 分子 O_2）需要 2 500 个叶绿素分子，也就是说 2 500 个分子的叶绿素吸收的光能才能用于 1 分子 CO_2 的固定，但是这种发现并没有说明固定 1 分子的 CO_2 到底需要吸收多少光。后来发现每固定 1 分子 CO_2，需要消耗 8 个光子，由此推算固定 1 个光子大约需要 300 个分子的叶绿素，也就是说叶绿素分子单枪匹马是不行的，必须由几百个叶绿素分子组成的功能单位才能进行光子的吸收。

后来的研究揭示，进行光吸收的功能单位是由叶绿素、类胡萝卜素、脂和蛋白质组成的复合物，即光系统（photosystem）。每一个光系统含有两个主要成分：捕光复合物（light - harvesting complex，LHC）和光反应中心复合物（reaction-center complex）。

典型的捕光复合物是由几百个叶绿素分子、数量不等但都与蛋白质连接在一起的类胡萝卜素分子所组成。当一个光子被捕光复合物中的一个叶绿素或类胡萝卜素分子吸收时，就有一个电子被激活，激发状态从一个色素向另一个色素传递，直到传递给反应中心：一对特别的叶绿素 *a*（图 8-15）。捕光复合物中色素激发状态的传递，实际是光能的传递，这种能称为共振能（resonance energy）。

反应中心复合物是由几种与叶绿素 *a* 相关的多肽以及一些与脂相连的蛋白质所构成，它们的作用是作为电子供体和受体。光系统中的光吸收色素的功能像是一种天线，将捕获的光能传递给中心的一对叶绿素 *a*，由叶绿素 *a* 激发一个电子，并进入光合作用的电子传递链。

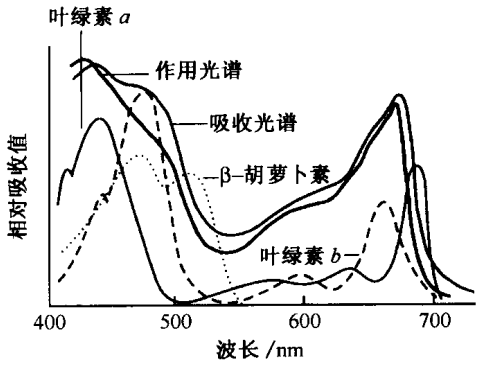


图 8-14　光合作用的作用光谱
（引自 Karp，1996）
图中的作用光谱是指不同波长光对植物叶光合作用的影响；吸收光谱是三种色素联合起来的吸收光谱，三种不同色素的吸收光谱用不同的线表示。

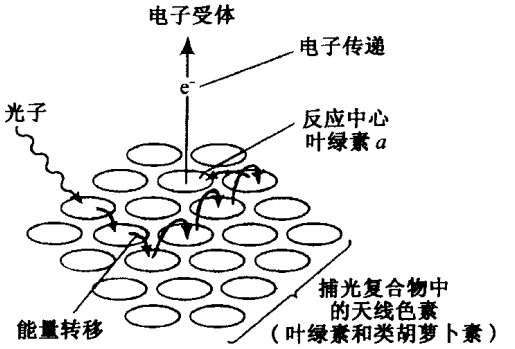


图 8-15　天线色素和反应中心叶绿素间的关系
（引自 Kleinsmith *et al*.，1995）

8.3.2.3　光能吸收、传递与转换

光的吸收和光能的传递是由光系统完成的。光系统中捕光复合物的聚光色素吸收光子后，由基态变为激发态，并通过共振机制极其迅速地相互传递，最后传给反应中心的一对特殊的

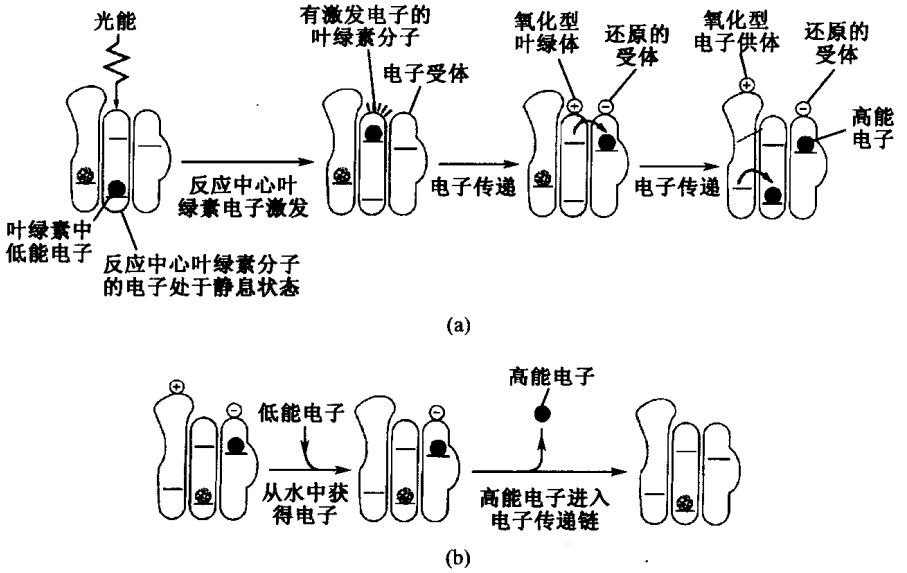


图 8-16　光系统对光能的获取与转换（引自 Alberts *et al*.，1998）
（a）反应中心的起始过程。一对特别的叶绿素分子紧紧地与色素-蛋白复合物结合在一起，左右两侧分别是低电动势和高电动势的供体和受体。一旦叶绿素中的电子被光能激发，就能传递到电子受体，并作为高能电子被稳定下来。带正电荷的叶绿素分子很快从供体中获取一个低能电子，从而回复到静息状态。整个反应不到 10^{-6}s。（b）从低能电子到形成高能电子过程。在此过程中使整个反应中心回复到静息状态，其中需从水中获得低能电子并使之成为类囊体膜中的高能电子。

叶绿素分子 a，这一对叶绿素分子与作为电子供体和受体的蛋白质紧紧地结合在一起。叶绿素 a 被激发成激发态，同时放出电子给初级电子受体（primary electron receptor），此时叶绿素 a 被氧化成带正电荷的氧化态，而受体被还原成带负电荷的还原型受体。氧化态的叶绿素 a 又可从原初电子供体处获得电子而恢复为原来的还原状态，原初电子供体则被氧化成氧化态，这样不断地氧化还原，就不断地把电子传递给原初电子受体，原初电子受体将高能电子释放进入电子传递链，完成了光能转化为化学能的过程（图 8-16）。

光能从一个色素分子向另一个色素分子的传递，对分子间的距离非常敏感。天线中的叶绿素分子间的距离非常近（不到 1.5nm），它们都是通过非共价键与膜蛋白结合，这些膜肽能够保持叶绿素分子定向排列以有利于能量传递。能量在天线色素分子间的传递有一个规则：能量只能向需要较少能量的分子传递，换句话说，能量只能向吸收较长波长（低能）光的色素分子传递，这样保证能量被最大限度地利用。据估计，光能从被吸收的位点开始传递到光反应中心色素约耗时 200×10^{-12}s。一旦到达反应中心，电子就能被传递给受体。

8.3.3 电子传递

电子传递是光反应的第二步。在光吸收过程中，光反应中心的叶绿素分子被激发释放了一个电子成为高能电子，这一过程仅仅完成了光能向电能的转换，接下来的问题就是如何使高能电子的自由能储备起来，同时使光反应中心的叶绿素分子获得低能电子以补充失去的电子，回复静息状态。这一过程涉及水的光解和电子传递，还涉及两对偶联氧化还原：O_2H_2O、$NADP^+$-NADPH。其中 H_2O 作为原初电子供体，$NADP^+$ 作为最终电子受体。水被光解释放电子的同时还释放 O_2 和 H^+，因此伴随电子传递的同时也会建立 H^+ 质子电化学梯度，以供 ATP 的合成。

类囊体膜上具有全部由光能转化为化学能所需的功能组分，包括捕光天线色素、两个光反应中心、各种电子载体、从水中摄取电子的酶以及合成 ATP 的系统。这些组分分别组装成膜蛋白复合物。这些复合物在类囊体膜上呈不对称分布。

8.3.3.1 电子载体和电子传递复合物

光合电子传递链（photosynthetic electron transfer chain）是由一系列的电子载体构成的，同线粒体呼吸链中电子载体的作用基本相似。但二者不同的是，线粒体呼吸链中的载体位于内膜，将 NADH 和 $FADH_2$ 的电子传递给氧，释放出的能量用于 ATP 的合成；而光合作用的电子载体位于类囊体膜上，将来自于水的电子传递给 $NADP^+$，并且这是一个吸热的过程而不是放热的过程。

同线粒体的呼吸链一样，光合作用的电子传递链中的电子载体也是细胞色素、铁氧还蛋白、黄素蛋白和醌等。

细胞色素　植物细胞有几个特殊的细胞色素参与光合作用的电子传递。其中主要的两种：细胞色素 b_6 和细胞色素 f 的吸收波长都已非常清楚，一个是 563 nm，另一个为 553 nm。细胞色素 f 是细胞色素 c 的一种，中等电位型；细胞色素 b_6 是低等电位型。

铁氧还蛋白　20 世纪 50 年代后期从植物叶中分离了一种铁硫蛋白，发现将这种铁硫

蛋白加入到分离的叶绿体中能够增强 $NADP^+$ 的还原能力。后来将这种蛋白称为铁氧还蛋白(ferredoxin)，含有一个氧化还原的位点，该位点有两个同硫结合的铁原子。如同其他的铁硫蛋白，铁氧还蛋白也是通过 $Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$ 的循环传递电子。在氧化状态，对波长在 420nm 和 463nm 的光有较强的吸收作用。

$NADP^+$ 还原酶（$NADP^+$ reductase）　参与光合作用电子传递的主要黄素蛋白是 $NADP^+$ 还原酶，这是一种含有 FAD 的酶，催化电子从铁氧还蛋白传递给 $NADP^+$。

质体蓝素（plastocyanin，PC）　一种含铜的蛋白质，氧化型呈蓝色，吸收光谱为 600nm。在还原状态时蓝色消失。传递电子时靠 $Cu^{2+} \rightarrow Cu^+$ 的状态循环。

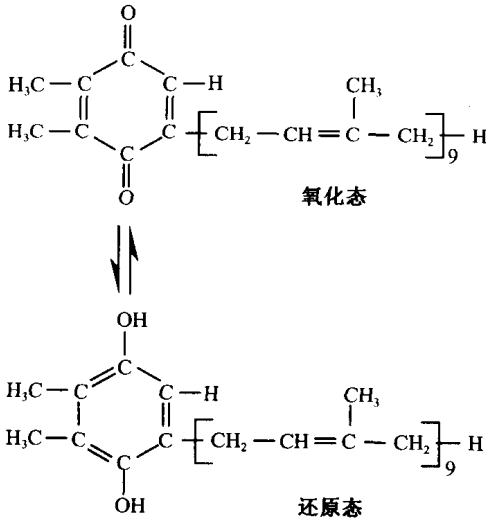


图 8-17　质体醌的氧化和还原状态

质体醌（plastoquinone，PQ）　质子和电子载体，同线粒体的电子传递链的泛醌一样，也是通过醌和醌醇循环来传递电子和氢质子，不过质体醌与泛醌的结构是不同的（图 8-17）。

$NADP^+$　是光合作用中的最后一个电子受体，是 NAD^+ 的衍生物。$NADP^+$ 接受两个电子成为还原型的 NADPH。

同线粒体的电子传递链的电子载体需组成复合物一样，光合作用中的电子载体也要组成复合物。在光合作用的电子传递链上一般有 3 种复合物，其中两种是光系统（光系统 II 和光系统 I）的组成部分，另一种是细胞色素 b_6/f 复合物（cytochrome b_6/f complex）。

Cyt b_6/f 复合物是类囊体膜上可分离出来的复合物，它由 4 个多肽组成：即细胞色素 f、细胞色素 b_6、1 个铁硫蛋白和 1 个分子质量为 17kDa 的多肽。前 3 个都是电子载体。细胞色素 f 也是 c 型的细胞色素，与线粒体的细胞色素 c_1 关系密切。该复合物位于基质面，功能是参与电子传递。

8.3.3.2　光系统 II 复合物的结构及功能

光系统 II 复合物（photosystem II complex，PSII complex）是类囊体膜的一种光合作用单位，它含有两个捕光复合物和一个光反应中心。构成 PSII 的捕光复合物称为 LHCII，而将 PSII 的光反应中心色素称为 P680，这是由于 PSII 反应中心色素吸收波长为 680nm 的光。

捕光复合物 II（light-harvesting complex II，LHC II）　又称捕光叶绿素-蛋白质复合物，或天线复合物（antenna complex），含有类囊体膜的叶绿素总量的 40%～60%，该复合物的作用是吸收光能及传递光能到作用中心。从豌豆植物中分离的 LHCII 是一种三体复合物，含有 3 个膜整合肽，每一个肽至少有 12 个叶绿素分子（7 个叶绿素 a 和 5 个叶绿素 b）、两个类胡萝卜素通过非共价键附着。

PSII 反应中心复合物　该反应中心复合物组成较为复杂，至少含有 6 个膜整合肽和几个紧密连接的脂，包括反应中心色素 P680、几十个叶绿素 a 和 b、类胡萝卜素等，其中有一

对特别的不含 Mg^{2+} 的叶绿素，称为褐藻素（pheophytin），简称 Pheo。这些色素与两个相关多肽 D1 和 D2 组成反应中心。此外，反应中心复合物还含有 4 个锰原子和细胞色素 b_{559} 的蛋白质片段。

PSII 的功能是利用从光中吸收的能量将水裂解，并将其释放的电子传递给质体醌，同时通过对水的氧化和 PQ_B^{2-} 的还原在类囊体膜两侧建立 H^+ 质子梯度（图 8-18）。

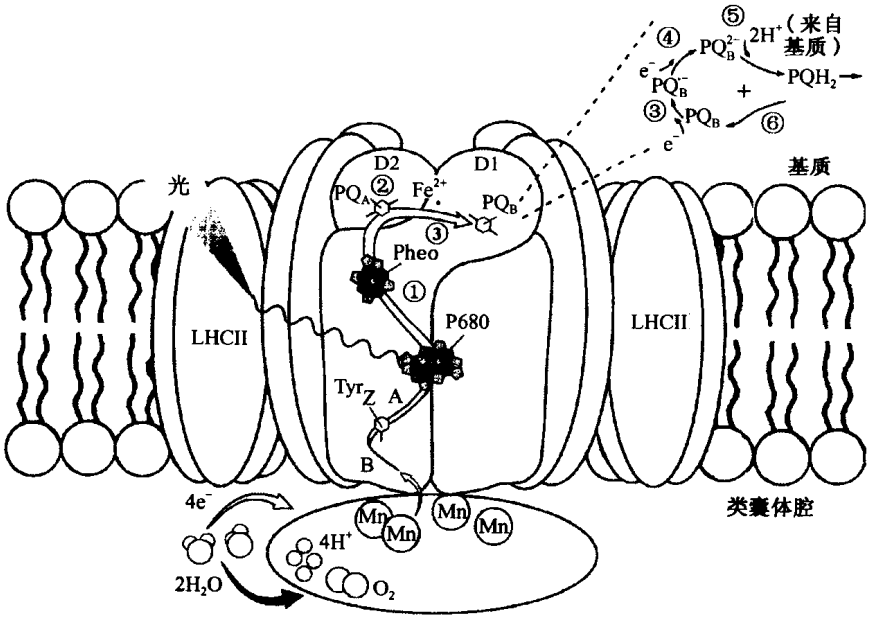


图 8-18　光系统 II 的功能结构（引自 Karp，1999）

图中显示 LHCII 中的天线色素吸收光，然后将光能从 LHC 传递给反应中心叶绿素 P680，P680 是一个二聚体。P680 吸收了光能激发了一个电子，并传递给 PSII 的原初电子受体脱镁叶绿素（Pheo），然后将电子传递给质体醌 PQ_A. 再传递给 PQ_B，形成负电的游离 $PQ_B^{\cdot -}$。当以同样的方式吸收第二个光子并传递第二个电子到达 $PQ_B^{\cdot -}$ 后，将 $PQ_B^{\cdot -}$ 转变成 PQ_B^{2-}，从叶绿体基质中摄取两个氢质子后，产生了 PQH_2，并被释放到膜的脂双层中，留下的空缺被新的 PQ_B 取代。在电子被传递时，来自水的电子经 Tyr_z 传递到反应中心色素（步骤 B 和 A）。总的看来，PSII 催化电子从水传递给质体醌，并且建立了氢质子梯度，这是因为水氧化释放的氢质子进入类囊体腔，使类囊体腔中氢质子浓度升高，同时又从基质中摄取 H^+ 将 PQ_B^{2-} 还原，降低了叶绿体基质中氢质子的浓度，从而建立了类囊体膜两侧的 H^+ 质子梯度。

PSII 行使功能的前提是吸收光能，PSII 将 LHCII 吸收的光能传递给 PSII 反应中心，使中心色素产生一个高能电子，并传递给原初电子受体。这一过程产生了带正电荷的供体（$P680^+$）和一个带负电荷的原初电子受体（$Pheo^-$），这一对相反带电性物质的形成非常重要，它们能够引发进一步的反应。因为 $P680^+$ 可以作为氧化剂，接受电子，引发水的光解，导致水氧化释放的电子向 PSII 的传递；而 $Pheo^-$ 可以作为还原剂，丢失一个电子，引起电子向质体醌的传递。

8.3.3.3 水的裂解与电子向 PSII 的传递

在实验条件下裂解水需要极强的电流或近乎 2000℃ 的高温，而植物细胞对水的裂解仅仅是利用可见光的能量。

PSII 在光反应中，反应中心色素被氧化成 $P680^+$，这是一个很好的氧化剂，它的氧还电位为 +1.1V，足以将水裂解（水的氧还电位是 +0.82V）。在水裂解反应（water-splitting reaction）中，每裂解两分子的 H_2O，释放 4 个电子、1 分子 O_2 和 4 个 H^+ 质子：$2H_2O \rightarrow O_2 + 4H^+ + 4e^-$，这一反应又称为水的光解作用（photolysis）。

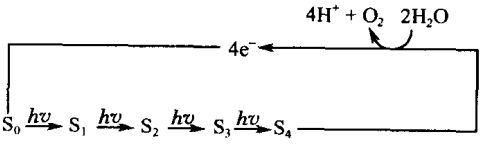


图 8-19 Mn 的电子传递与水的光解
（引自 Karp，1999）
S 表示 Mn 基团的正电荷数

值得注意的是水的光解释放出了 4 个电子，而 $P680^+$ 一次只能接受一个电子，如何解释这种现象？可能的机制是（图 8-19）：

水的光解是由含锰的蛋白质复合物介导的。该复合物中 4 个锰（Mn）与 PSII 的 D1 蛋白紧密地靠在一起，每个锰离子可以传递一个电子。4 个锰离子可以连续 4 次，每次传递一个，共传递 4 个电子给邻近的 $P680^+$，使 Mn 带上正电荷。Mn 传递的电子经过带正电荷的酪氨酸（Tyr_z^+）才能传给 $P680^+$（图 8-18），Tyr_z 也可写成 TyrZ，它是反应中心的一种含酪氨酸残基的蛋白。Mn 基团每传递一个电子给 $P680^+$，使其成为还原型的 P680 后，PSII 又可吸收一个光子，P680 又被氧化成 $P680^+$，以此反复，直到 4 个 Mn 都释放了电子成为氧化型之后，PSII 的氧释放复合物（oxygen-release complex）才能从 2 分子水中移去 4 个电子，形成一分子氧，并使 Mn 回复到原始状态（S_0 state）。

从水光解释放的电子传递给 PSII 的 P680，再从 P680 传递给 Q_B 的路线综合如下：$H_2O \rightarrow Mn \rightarrow P680 \rightarrow$ 脱镁叶绿素（Pheo）$\rightarrow Q_A \rightarrow Q_B$。

8.3.3.4 光系统 I 复合物的结构及电子传递

光系统 I 复合物（photosystem I complex，PSI complex）是类囊体膜中另一种光合作用单位，它含有一个捕光复合物和一个光反应中心。构成 PSI 的捕光复合物称为 LHCI，而将 PSI 的光反应中心色素称为 P700，这是由于 PSI 反应中心色素吸收波长为 700nm 的光。

PSI 至少含有 11 种不同的与膜结合的多肽和几种结合紧密的脂类，包括 P700。LHCI 含有一百多个叶绿素 *a* 和 *b*，以及其他一些与蛋白质结合的色素。PSI 的功能是将电子从质体蓝素传递给铁氧还蛋白（ferredoxin，Fd），一种与类囊体膜表面松散结合的小分子蛋白。电子从质体蓝素传递给铁氧还蛋白在热力学上是不利的，需要光能去驱动。

PSI 的 LHCI 吸收一个光子，然后将吸收的光能传递给反应中心的一对特别的叶绿素 P700，使其中一个成为激发态从而释放一个电子，释放的电子经一系列与蛋白质结合的电子载体：A_0、A_1、FeS_x、FeS_A、FeS_B 传递给铁氧还蛋白。其中 A_0 是一种叶绿素 *a*，A_1 是一种醌，称为叶绿醌（或维生素 K_1）。而 FeS_x、FeS_A、FeS_B 都是铁硫中心，可分别简称写成 F_X、F_A、F_B。在 PSI 的电子传递中，P700 释放的电子被传递给铁氧还蛋白，同时从质体蓝素中接收一个低能电子得以补充（图 8-20）。PSI 参与的电子传递路线是：质体蓝素（Cu^{2+}）$\rightarrow$P700$\rightarrow$：

$A_0 \rightarrow A_1 \rightarrow FeS_x \rightarrow FeS_A \rightarrow FeS_B \rightarrow$铁氧还蛋白。

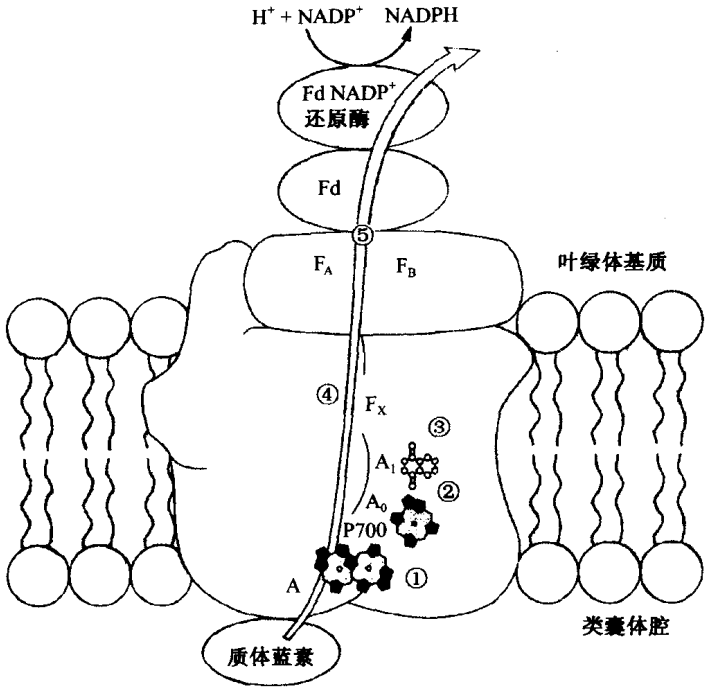


图 8-20 光系统 I 的功能结构（引自 Karp，1999）

LHCI 吸收的光能被传递到反应中心色素 P700，P700 吸收光能后，激发了一个电子，传递给 A_0（PSI 的原初电子受体），然后经 A_1、F_x、F_A、F_B 传递给铁氧还蛋白。当两种不同的氧还蛋白接收电子后，两个蛋白共同作用将 $NADP^+$ 还原成 NADPH。

8.3.3.5 电子从 PSII 向 PSI 传递

上面分别讨论了电子从水传递到 PQH_2，以及从 PC 传递给铁氧还蛋白，那么电子是如何从 PSII 传递到 PSI 的呢？

PQH_2 是一种脂溶性的分子，并且是可动的分子，在脂双层中通过扩散进行移动，它的结构和功能与线粒体呼吸链中的辅酶 Q 相似。在光合作用中，PQH_2 中的电子能够传递给 Cyt b_6/f 复合物，同时将氢质子释放到类囊体的腔，由于 PQH_2 的氢质子来源于叶绿体基质，所以这一过程实际上是将 H^+ 进行了跨膜转运，有利于质子梯度的建立。Cyt b_6/f 复合物接受电子后，经 $b_6 \rightarrow FeS \rightarrow f$，再传递给另一个可动的水溶性的电子载体质体蓝素，这是一种含

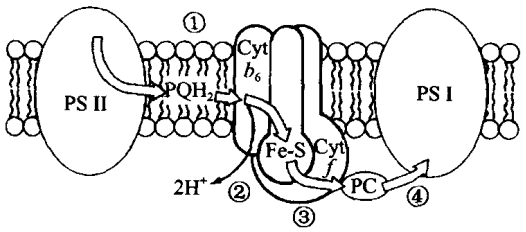


图 8-21 电子在 PSII 与 PSI 之间的传递（引自 Karp，1996）

铜的蛋白，位于类囊体膜的腔面，然后再传递给 PSI 的 $P700^+$（图 8-21）。

8.3.3.6 电子传递的两种途径：非循环式与循环式

由于在光合作用的电子传递链中有两个光系统，它们都能吸收光能进行光反应，所以会形成两个高峰（hill），通常用 Z 形图来表示电子传递过程。根据电子的最后去向，分为两种方式：非循环式电子传递途径（noncyclic electron transfer pathway）和循环式电子传递途径（cyclic electron transfer pathway）。

非循环式电子传递 在这种方式中，电子从水开始，经 PSII、质体 Q、复合物 b_6/f、PC、PSI、Fd，最后传递给 $NADP^+$（图 8-22），这种方式又称为线性电子流，或 Z 形路线。

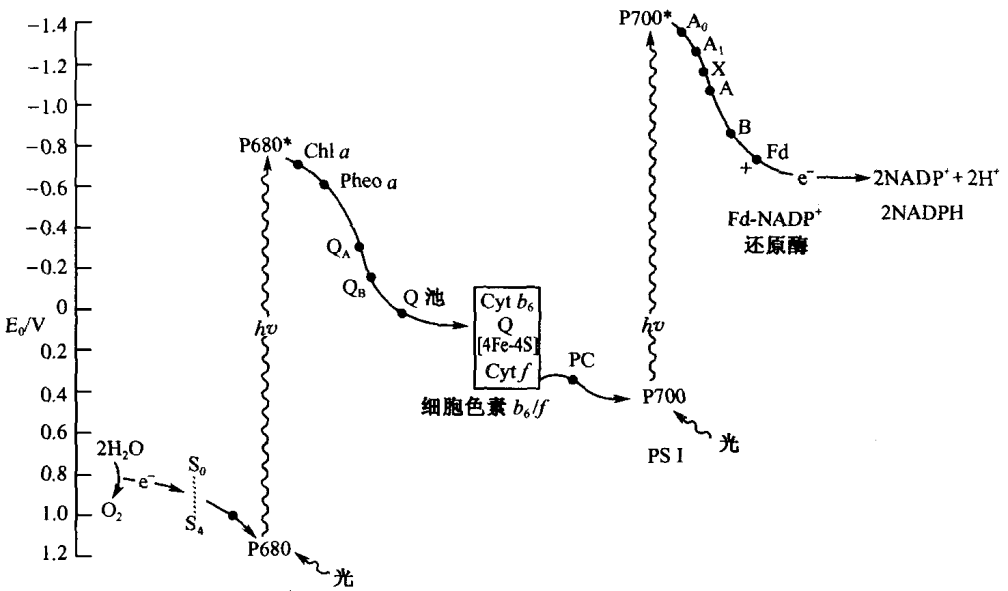


图 8-22 光合作用中线性电子传递 Z 形图（引自 Voet *et al*., 1995）

在非循环式电子传递途径中，电子的最终受体是 $NADP^+$，有两个原初受体 Pheo 和 A_0。电子供体是来自光解的水。

可以将线性电子流分为 4 个阶段：①电子从 PSII 的 P680 传递给 PQ，生成 PQH_2；②水光解释放的电子经 Mn 传递给 PSII 的 $P680^+$；③电子从 PQH_2 经复合物 b_6/f 传递给质体蓝素（PC），即电子从 PSII 传递给 PSI；④电子经 $P700^+$ 传递给铁氧还蛋白（Fd），最后在铁氧还蛋白-$NADP^+$ 还原酶的作用下，电子被 $NADP^+$ 接收。

循环式电子传递途径 在非循环式电子流中，被传递的电子，经过两个光系统接力合作，最终被 $NADP^+$ 接收，并将 $NADP^+$ 还原成 NADPH。在循环式电子传递途径中，被传递的电子经 PSI 传递给 Fd 之后，不是进一步传递给 $NADP^+$，而是重新传递给 Cyt b_6/f 复合物，再经 PC 又回到 PSI，形成了闭路循环（图 8-23）。

造成循环式电子流的主要原因是 $NADP^+$ 的浓度不足，或者说 NADPH 的浓度过高，所以 Fd 只能将电子传回给 Cytb_6/f。这种电子流对光合作用具有重要的调节作用，主要是调节光

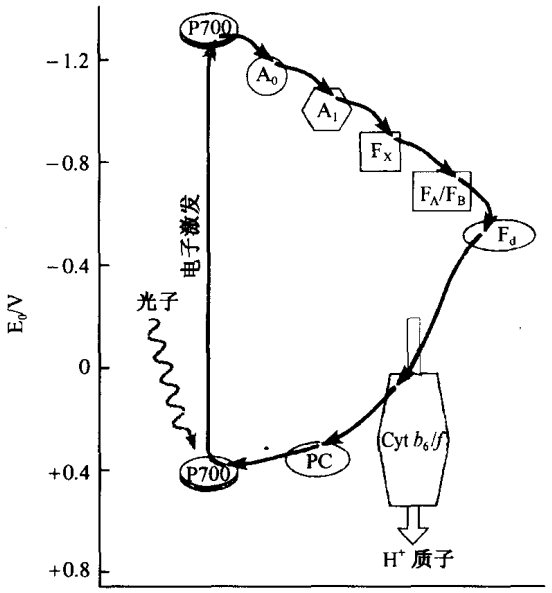


图 8-23　循环式电子流（引自 Becker *et al*., 1996）

电子传递到 Fd 之后，又重新传递给 Cyt b_6/f，再经 PC 传递给 PS Ⅰ的 $P700^+$，形成回路。

反应中合成的 ATP 与还原的 NADPH 的比值，因为在暗反应中，固定 CO_2 时既需要 ATP 也需要 NADPH，二者间应有一个合适的比例，保持平衡。

8.3.4　光合磷酸化

从总体上讲光合作用是一种转变能量并储存能量的过程，即将光能转变为化学能并贮备起来的过程。首先要吸收光子，利用光能将水分子中处于非常低的自由能的电子驱动转移到自由能非常高的 NADPH 中。在光合作用的光反应中，除了将一部分光能转移到 NADPH 中暂时储存外，还要利用另外一部分光能合成 ATP，将光合作用与 ADP 的磷酸化偶联起来，即是光合磷酸化（photophosphorylation）。它同线粒体的氧化磷酸化的主要区别是：氧化磷酸化是由高能食物分子（如糖、脂肪）氧化驱动的，而光合磷酸化是由光子驱动的。光合磷酸化同样需要建立电化学质子梯度、ATP 合酶，其机制也可用化学渗透假说来解释。

8.3.4.1　电子传递与 H^+ 质子电化学梯度的建立

线粒体内膜在进行电子传递的同时建立了 H^+ 质子梯度，在叶绿体进行的光反应中，类囊体的膜在进行电子传递的同时，会在类囊体膜两侧建立 H^+ 质子梯度。类囊体膜两侧 H^+ 质子梯度的建立，主要有 3 种因素：①首先是水的光解，在释放 4 个电子、1 分子 O_2 的同时，释放 4 个 H^+。水的裂解是在类囊体的腔中进行的，所以水的裂解导致类囊体腔中 H^+ 浓度的增加。②Cytb_6/f 复合物具有质子泵的作用，当 P680 将电子传递给 PQ 时，从基质中摄取了两个 H^+，形成 PQH_2，传递 4 个电子，则要从基质中摄取 4 个 H^+。当 PQH_2 将电子传递给 Cytb_6/f 复合物时，2 分子 PQH_2 的 4 个 H^+ 全被泵入类囊体的腔，叶绿体腔中 H^+ 浓度降低

的同时，类囊体腔中 H^+ 浓度进一步提高。③当电子最后传递给 $NADP^+$ 时，需从基质中摄取 2 个 H^+ 质子将 $NADP^+$ 还原成 NADPH，这样又降低了基质中的 H^+ 质子的浓度，其结果使类囊体膜两侧建立了 H^+ 质子电化学梯度（图 8-24）。

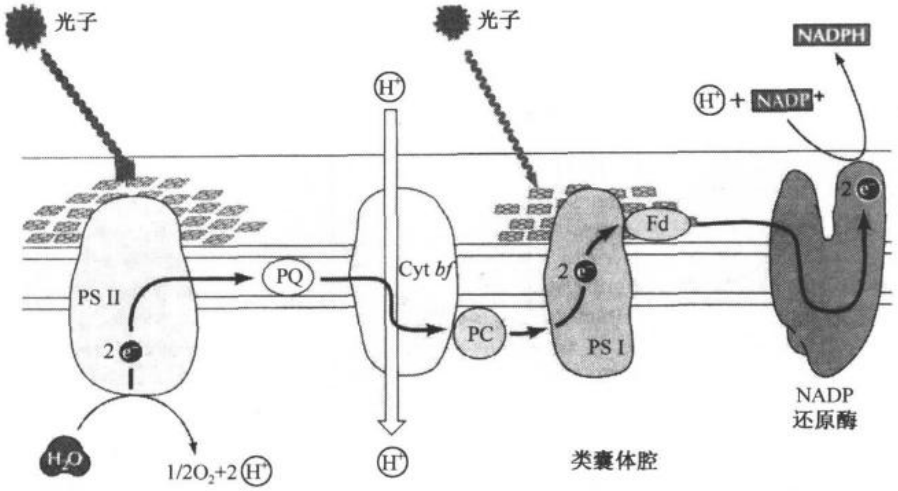


图 8-24　类囊体膜进行的电子传递与 H^+ 梯度建立（引自 Cooper，2000）

8.3.4.2　CF_0-CF_1 ATP 合酶

光合磷酸化的能量转换单位是 CF_0-CF_1 ATP 合酶（CF_0-CF_1 ATP synthase）或称 CF_0-CF_1 ATP 酶复合体（CF_0-CF_1 ATPase complex），位于基粒和基质类囊体膜上，朝向叶绿体基质（图 8-25），简称 CF_1 颗粒，C 代表叶绿体，以便与线粒体 ATP 合酶相区别。同线粒体的 F_1 颗粒一样，CF_1 颗粒也是由两部分组成，即头部（CF_1）和膜部（CF_0）。CF_1 有 5 种亚基：α、β、γ、δ、ε，分子质量分别是 59、56、37、17、13kDa. 在 β 亚基上有 ATP、ADP 结合和催化位点。δ 亚基与 CF_0 结合。γ 亚基控制质子流动。CF_0 至少有 4 种亚基，分别称为 I、II、III、IV。ATP 合酶的激活与线粒体的不同，需要 SH 化合物，同时还要 Mg^{2+}。另外，F_1 颗

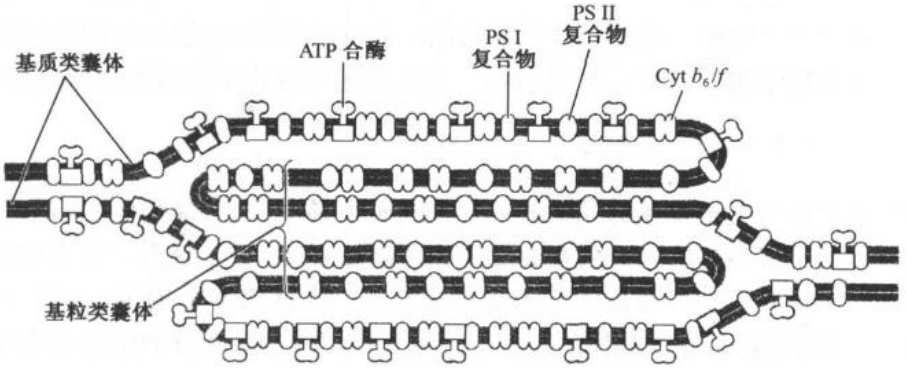


图 8-25　基粒和基质类囊体膜中 CF_1 颗粒及其他复合物的分布（引自 Karp，1996）

粒只要通过两个 H^+ 就可以合成 1 分子 ATP，而 CF_1 颗粒需要通过 3 个 H^+ 才能合成 1 分子 ATP。

通过离体实验不仅证明了 CF_1 颗粒就是 ATP 合酶，是偶联光合磷酸化的装置。还证明了 CF_1 颗粒在类囊体膜中合成 ATP 时，除了需要 ADP 和 P_i，还需要 pH 梯度（图 8-26）。

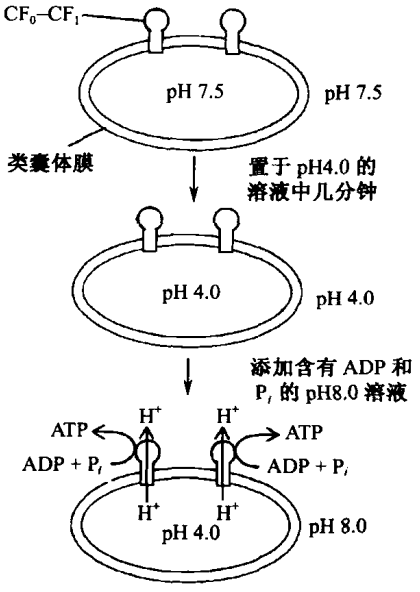


图 8-26　CF_1 利用人工 pH 梯度、ADP 和 P_i 合成 ATP（引自 Lodish *et al*., 1995）

实验中，首先分离纯化含有 CF_0-CF_1 的类囊体小泡置于 pH7.5 的溶液中平衡后，再于暗处置于 pH4.0 的溶液中，使类囊体小泡膜内外的 pH 平衡（pH 达到 4.0）后，将类囊体小泡置于含有 ADP 和 P_i 的溶液中，很快就有 ATP 的合成，并有 H^+ 质子从类囊体小泡中输出。

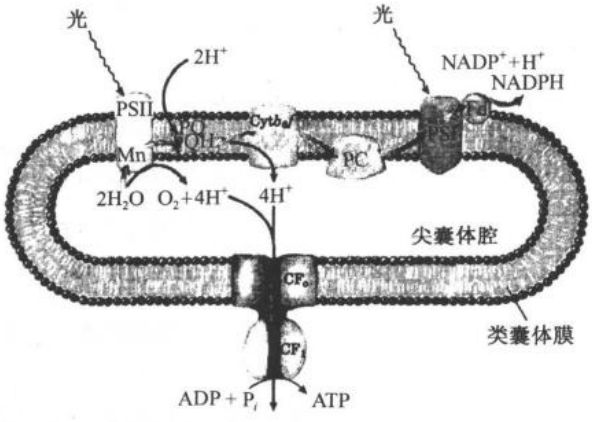


图 8-27　非循环式光合磷酸化（引自 Nelson *et al*., 2000）

8.3.4.3　电子传递与光合磷酸化

在光合作用的光反应中，伴随电子传递在类囊体膜两侧建立了 pH 梯度（H^+ 质子梯度），同时在类囊体膜中有 ATP 合成装置，这样，H^+ 质子电化学梯度有了将自由能转变成 ATP，即光合磷酸化的基本条件。

由于电子传递有线性传递和循环式传递，而这两种电子传递都伴随有 ATP 的合成，因而有两种类型的光合磷酸化：非循环式光合磷酸化和循环式光合磷酸化。

非循环式光合磷酸化（non-cyclic photophosphorylation）　在线性电子传递中，光驱动的电子经两个光系统最后传递给 $NADP^+$，并在电子传递过程中建立 H^+ 质子梯度，驱使 ADP 磷酸化产生 ATP。非循环式电子传递和光合磷酸化的最终产物有 ATP、NADPH、分子氧（图 8-27）。

光合磷酸化的机制与线粒体的氧化磷酸化相似，同样可用化学渗透学说来说明。在电子传递和 ATP 合成之间，起偶联作用的是膜内外间存在的质子电化学梯度。类囊体膜进行的光合电子传递与光合磷酸化需要 4 个跨膜复合物参加：PSⅡ、Cytb_6/f 复合物、PSⅠ和 ATP 合酶。有 3 个可动的分子（质子）：质体醌、质体蓝素和 H^+ 质子将这 4 个复合物在功能上连成

一体：即完成电子传递、建立质子梯度、合成 ATP 和 NADPH。

循环式光合磷酸化（cyclic photophosphorylation）　在循环式电子传递中，光驱动的电子从 PSⅠ传递给铁氧化还原蛋白后不是进一步传递给 $NADP^+$，而是经 PQ 传递给 Cytb_6/f 复合物，再经由 PC 而流回到 PSⅠ。在此过程中，电子循环流动，促进质子梯度的建立，并与磷酸化相偶联，产生 ATP，故称为循环式光合磷酸化（图 8-28）。

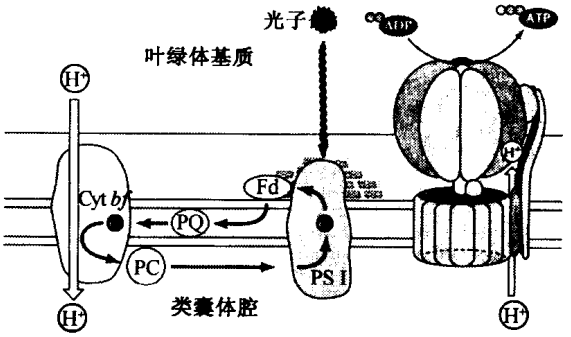


图 8-28　循环式光合磷酸化（引自 Cooper，2000）

循环式光合磷酸化的产物仅为 ATP，无 NADPH 和分子氧。循环式光合磷酸化约占光合磷酸化的 10%～20%，特别是 $NADP^+$ 不足时，所占的比例增大，因此它对光反应中产生的 ATP 和 NADPH 的比例具有调节作用。由于 $NADP^+$ 接收电子被还原时，同时需要从叶绿体基质中摄取一个 H^+，如果基质中 $NADP^+$ 浓度不高，或 NADPH 的浓度过高，说明 NADPH 与 ATP 的比例失调，需要加以调整。调整的机制是将电子回传给细胞色素 b_6/f 复合物，细胞色素 b_6/f 复合物是一种质子泵，得到电子从而有足够的自由能将基质中的 H^+ 跨膜传递到类囊体腔，使类囊体腔中质子梯度升高；高浓度的 H^+ 质子通过 CF_0-CF_1ATP 合酶的 H^+ 通道返回叶绿体基质，从而促进了 ATP 的合成，其结果，调整了光反应中 ATP 和 NADPH 的比值，有利于 CO_2 的固定。

8.4　光合作用的暗反应

光合作用的第二阶段是进行 CO_2 的固定，合成糖。叶绿体利用光反应产生的 NADPH 和 ATP 的化学能，使 CO_2 还原合成糖。由于这一过程不需要光，故称为暗反应（dark reaction），它在叶绿体基质中进行。

8.4.1　C_3 途径：卡尔文循环

二次世界大战之后，美国加州大学贝克利分校的 Calvin 和他的同事们一起研究 CO_2 是如何被固定，又是如何结合到有机分子中的。使用的是 ^{14}C 示踪和双向纸层析技术，研究的材料开始是植物叶片，后来用小球藻。

将培养的小球藻生长在含有未标记 CO_2 的密闭容器中，然后将标记的 CO_2 注入培养基，培养适当时间后，将培养的藻浸入热的乙醇中，这种处理有 3 种功效：杀死细胞、终止酶的

作用、提取溶解的分子。然后将提取物点在层析纸上进行双向纸层析，最后通过放射自显影分析放射性斑点并同已知化学成分进行比较。通过反复多次实验研究，查清了 CO_2 被固定和糖合成的途径：卡尔文循环（Calvin cycle）。

在卡尔文的实验中，发现标记的 CO_2 转变成有机物的速度很快，几秒钟之内，在层析纸上就有放射性的斑点。经测定，斑点中的化学成分是磷酸甘油酸（phosphoglycerate，PGA），是糖酵解的中间体。卡尔文根据这一发现推测：CO_2 与一个二碳物质共价连接形成了三碳的 PGA。由于被鉴定到的第一个中间体是三碳分子，CO_2 的这种固定途径称为 C_3 途径（C_3 pathway），将通过这种途径固定 CO_2 的植物称为 C_3 植物（C_3 plant）。最终的研究结果发现，CO_2 固定的 C_3 途径是一个循环过程，称为 C_3 循环（C_3 cycle），由于这一循环是卡尔文发现的，故又称卡尔文循环（图 8-29），可分为 3 个阶段：羧化、还原和 RuBP 的再生。

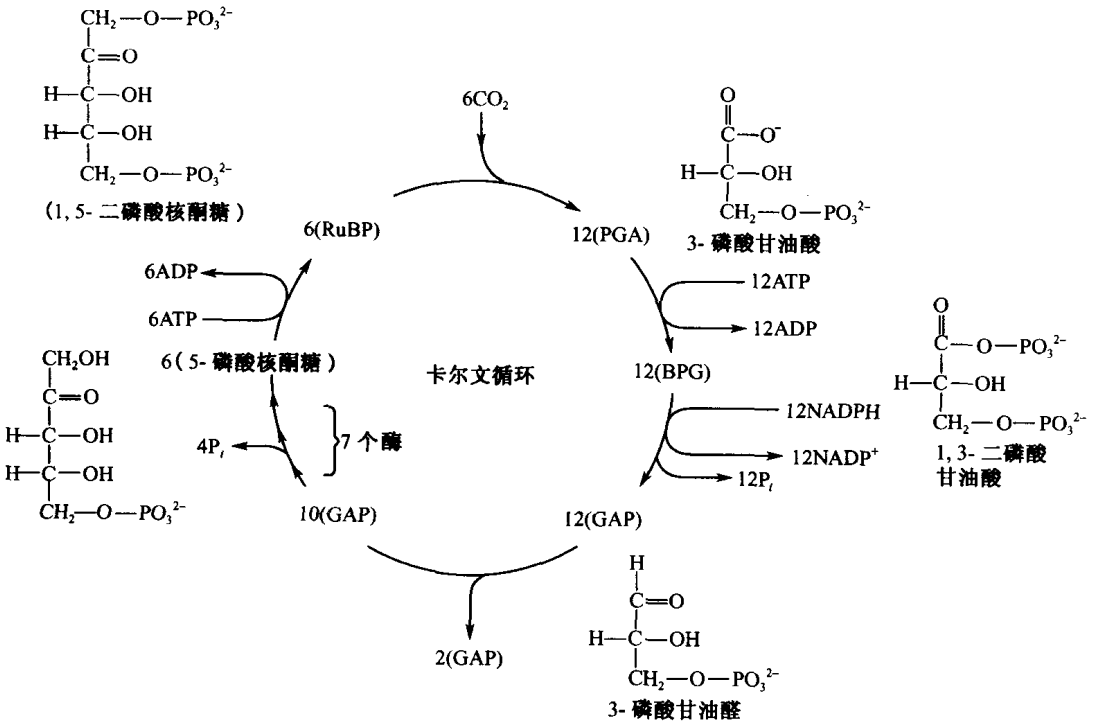


图 8-29　卡尔文循环（改自 Lodish *et al.*, 1995）

（1）CO_2 的羧化　后来的研究发现，CO_2 并不是先与一个二碳的分子共价连接，其受体是一个 5 碳糖：核酮糖 1，5-二磷酸（ribulose 1，5-biophosphate，RuBP）。所以 CO_2 在被还原之前，在 RuBP 羧化酶（ribulose bisphosphate carboxylase）的催化下，以 RuBP 作为 CO_2 受体，首先被固定形成羧基，然后裂解形成两分子的 3-磷酸甘油酸（图 8-30）。

（2）还原阶段　3-磷酸甘油酸被还原成 3-磷酸甘油醛。在此过程中，3-磷酸甘油酸首先在磷酸甘油酸激酶的催化下被 ATP 磷酸化形成 1，3-二磷酸甘油酸，然后在甘油醛磷酸脱氢酶的催化下被 NADPH 还原成甘油醛-3-磷酸（glyceraldehyde-3-phosphate，GAP）。这是一个吸能反应，光反应中合成的 ATP 和 NADPH 主要是在这一阶段被利用。还原反应是光反应和暗反应的连接点，一旦 CO_2 被还原成甘油醛-3-磷酸，光合作用便完成了储能过程。

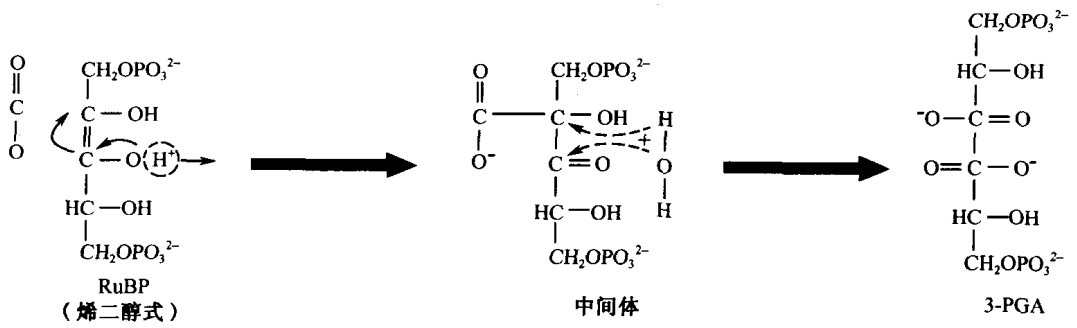


图 8-30　RuBP 羧化酶催化固定 CO_2

在 RuBP 羧化酶的催化下 以 RuBP 为受体，CO_2 被固定成中间体的羧基，然后裂解成两分子 3-PGA。

（3）RuBP 的再生　　由于 RuBP 是 CO_2 的受体，所以参与 CO_2 固定的 RuBP 必须迅速被还原，以便进行再循环，卡尔文循环的第三个过程是 RuBP 的再生。

利用已生成的甘油醛-3-磷酸经一系列的相互转变最终再生成 5-磷酸核酮糖，然后在磷酸核酮糖激酶的作用下，发生磷酸化作用生成 RuBP，再消耗一个 ATP。

综上所述，三碳循环是靠光反应形成的 ATP 及 NADPH 作为能源，推动 CO_2 的固定、还原，每循环一次只能固定一个 CO_2，循环 6 次，才能把 6 个 CO_2 分子同化成一个己糖分子：

$$6CO_2 + 18ATP + 12NADPH \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 18ADP + 18P_i + 12NADP^+$$

实际上，通过卡尔文循环，将 CO_2 转变成葡萄糖通常需要消耗 18 分子的 ATP 和 12 分子的 NADPH。六碳糖的合成是在胞质溶胶中进行的，叶绿体通过光合作用合成的 3-磷酸甘油醛作为六碳糖合成的原料被交换转运到胞质溶胶中，通过缩合反应，2 分子的 GAP 合成 1 分子的 1，6-二磷酸果糖，然后再进一步转变成葡萄糖。

8.4.2　光呼吸和 C_4 植物

8.4.2.1　光呼吸

1920 年，德国生化学家 Warburg 最先注意到提高 O_2 的浓度会抑制 CO_2 的固定，这种抑制作用是光呼吸（photorespiration）引起的。所谓光呼吸是一种依靠光来消耗 O_2，放出 CO_2 的作用。在光存在下，光呼吸降低了光合作用的效率，因为光呼吸氧化光合作用中产生的还原型的碳原子，同时消耗了大量的能量。

rubisco 除了作为羧化酶催化将 CO_2 添加到 1，5-二磷酸核酮糖，生成 2 分子 3-磷酸甘油酸外，也可作为加氧酶，利用分子氧催化 1，5-二磷酸核酮糖裂解成 3-磷酸甘油酸和磷酸乙醇酸（phosphoglycolate），见图 8-31。

rubisco 同氧的亲和力比与二氧化碳的亲和力低得多，所以 RuBP 的氧化反应要比羧化反应慢。可以推测，一般情况下这种氧化作用对羧化反应构不成威胁，但是当 CO_2 的浓度很低而 O_2 的浓度很高时，O_2 就要取代 CO_2 作为 rubisco 的底物。将叶或藻类细胞置于 CO_2/O_2 低的气体环境中，发现 RuBP 每发生 2～3 个羧化反应就要发生一次氧化反应。

生活在某些环境下的植物往往会受到这种影响。如生活在因强烈光照导致炎热和干旱地

区的植物叶绿体中容易发生 RuBP 的氧化作用，因为这种环境会使叶绿体基质中 CO_2/O_2 的值降低。虽然温度的升高，CO_2、O_2 的溶解性都会降低，但 CO_2 的溶解性下降更快，其结果导致基质中 CO_2/O_2 值的降低。另外，生活在干旱地区的植物，为了防止水分蒸发，会关闭气孔，CO_2 就不能进入叶中，没有稳定的 CO_2 供给同化作用，叶细胞中的 CO_2 的浓度进一步下降。但是，叶绿体中水的光解继续进行，由于释放的 O_2 不能扩散出叶，使得细胞内 O_2 的浓度不断增加，进而严重影响光合作用。

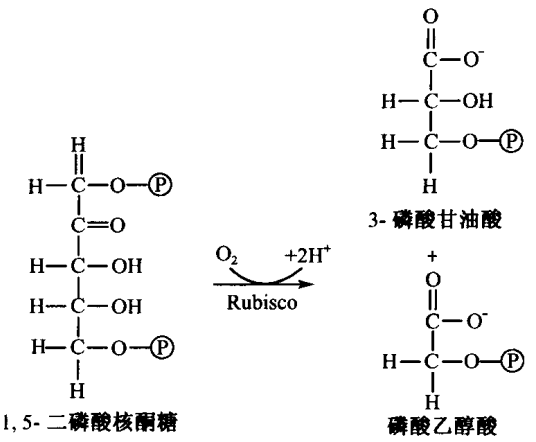


图 8-31　1，5-二磷酸核酮糖的氧化裂解

8.4.2.2　C_4 植物

某些植物在进化过程中形成了一种特别的机制克服光呼吸对光合作用的影响。由于光呼吸是在低 CO_2 的情况下发生的，这些植物通过一种特别的代谢途径在进行光合作用时维持高 CO_2 浓度，降低呼吸作用。具有这种性质的植物包括甘蔗、玉米和一些热带草本植物。

1965 年，Kortschak 报道，将 $^{14}CO_2$ 加到甘蔗中，发现放射性首先出现在四碳骨架中，而不是出现在 PGA 中。进一步分析发现，这些四碳物质是 CO_2 同磷酸烯醇式丙酮酸（PEP）结合的结果，因此发现了 CO_2 固定的第二种途径：简称 C_4 途径（C_4 pathway）。利用这种途径固定 CO_2 的植物称为 C_4 植物。不同植物的 C_4 途径有所差异，但有一个共同的功能：将高浓度的 CO_2 传递给卡尔文循环。

C_3 植物叶细胞的光合作用发生在叶肉细胞中。与 C_3 植物不同的是，C_4 植物的叶中有两

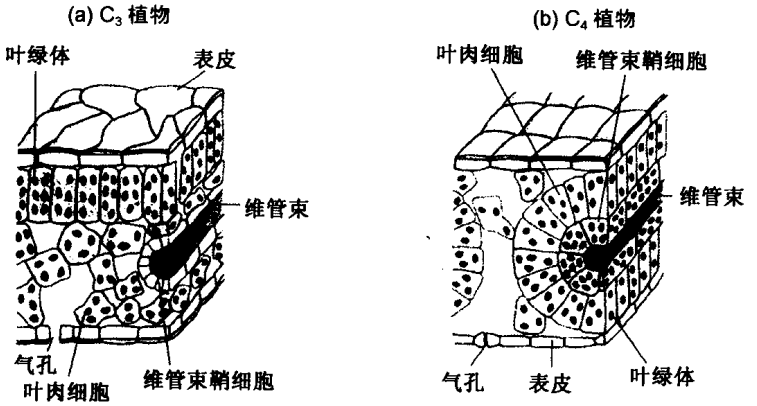


图 8-32　C_3 和 C_4 植物叶细胞结构的差异（引自 Alberts *et al*., 1994）

(a) 在 C_3 植物中，卡尔文循环发生在叶肉细胞；(b) 在 C_4 植物中，卡尔文循环发生在维管束鞘细胞，位于组织的内层。C_4 植物利用叶肉细胞固定 CO_2，然后在维管束鞘细胞中释放，保证了 CO_2 的高浓度进入卡尔文循环。

种不同类型的光合作用细胞：叶肉细胞（mesophyll cell）和维管束鞘细胞（bundle sheath cell）。C_4 植物中 CO_2 的固定是在叶肉细胞中进行的，被固定的 CO_2 在维管束鞘细胞中释放，这种细胞位于叶组织的内层，卡尔文循环系统位于维管束鞘细胞中（图 8-33）。

在 C_4 植物中，CO_2 的固定反应是在叶肉细胞的胞质溶胶中进行的，在磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的催化下将 CO_2 连接到磷酸烯醇式丙酮酸（PEP）上，形成四碳酸：草酰乙酸（oxaloacetate）。草酰乙酸被转变成其他的四碳酸（苹果酸和天冬氨酸）后运输到维管束鞘细胞，在维管束鞘细胞中被降解成 CO_2 和丙酮酸，CO_2 在维管束鞘细胞中进入卡尔文循环。由于 PEP 羧化酶的活性很高，所以转运到叶肉细胞中的 CO_2 的浓度很高，大约是空气中的 10 倍。这样，即使在恶劣的环境中，也可保证高 CO_2 浓度，降低光呼吸作用对光合作用的影响（图 8-33）。

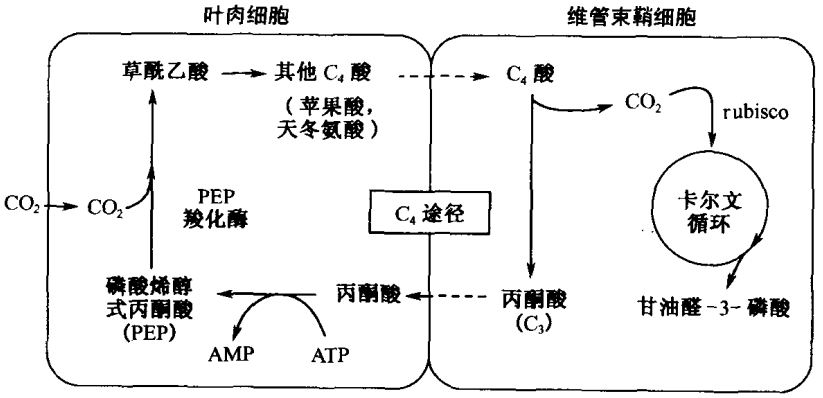


图 8-33　CO_2 固定并向卡尔文循环传递的 C_4 途径（引自 Kleinsmith *et al.*, 1995）

8.4.2.3　CAM 植物

在 C_4 植物中，由 PEP 羧化酶在一种类型的细胞中固定 CO_2，然后在另一种类型的细胞中将固定的 CO_2 释放出来供卡尔文循环时再固定。某些生长在干热环境中的植物，用直接的方式提高 CO_2 固定效率，而不需要两种不同类型的细胞参与。如肉质植物（succulent），含有厚厚的肉叶，主要是叶肉细胞组成的。肉质植物对 CO_2 的固定方式很特别，并最早发现于景天酸属（*Crassulaceae*）植物，所以将 CO_2 的这种代谢类型称为景天酸代谢（crassulacean acid metabolism，CAM）。

同其他植物一样，CAM 植物的叶中也有许多气孔，能够打开和关闭以控制叶中废气和空气的交换。当天气炎热和干燥时，CAM 植物遇到在白天如何获得足够的 CO_2 的问题，如果打开气孔吸收 CO_2，但又会损失过多的水分到炎热的空气中。为了解决这一问题，CAM 植物主要是在夜间打开气孔，因为夜间空气凉爽湿度高。

CAM 植物也是通过 PEP 羧化酶固定 CO_2，固定反应发生在胞质溶胶中，产生大量的四碳酸：苹果酸。夜间形成的苹果酸暂时储存在叶肉细胞的中央液泡中，到了白天，气孔关闭，PEP 羧化酶暂时失活，苹果酸从液泡扩散到胞质溶胶中，然后被裂解释放 CO_2，进入卡尔文循环。到了夜间，气孔又打开，PEP 羧化酶被激活，开始新的循环。CAM 植物与 C_4 植物相

似之处是 CO_2 需要固定两次，不同之处是 CAM 植物不需要两种类型的细胞协同工作。

8.5 叶绿体遗传

叶绿体同线粒体一样，也是半自主性细胞器（semiautonomous organell）。叶绿体也有自己的 DNA，它的生长和增殖受核基因组和自身的基因组两套遗传系统的控制。

8.5.1 叶绿体遗传

8.5.1.1 叶绿体基因组

叶绿体基因组呈环状。不同植物的叶绿体基因组的大小变化很大，高等植物的叶绿体通

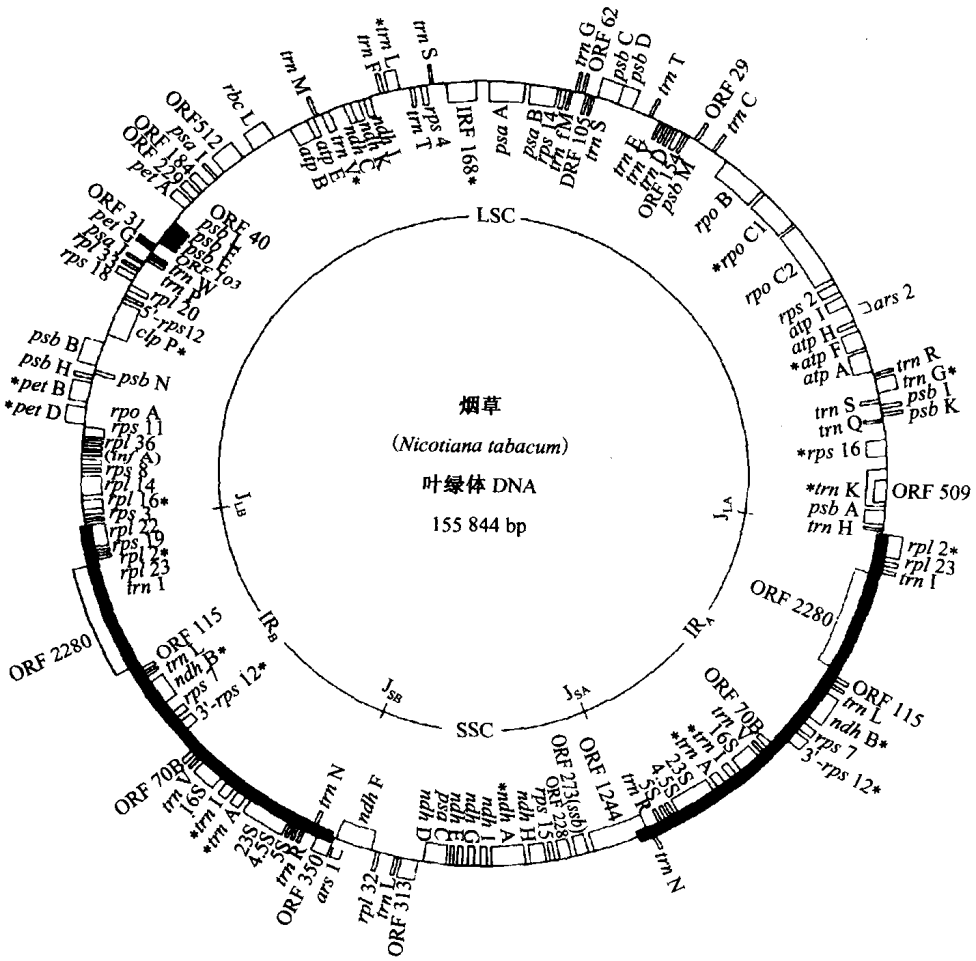


图 8-34 烟草叶绿体基因组的基因图谱（引自 Sugiura，1992）

内侧的基因是顺时针转录，外侧的基因是逆时针转录。星号表示断裂基因，ORF 表示主要的可读框，IRF 表示含有内含子的可读框。IR 表示反向重复；LSC 表示大的单拷贝区；SSC 表示小的单拷贝区。J 表示 IR 和 LSC/SSC 间的连接处。

常为 20～160kb，绿藻叶绿体基因组较小，长为 85kb。在高等植物中，叶绿体基因组是多拷贝的，通常可达 20～40 个。叶绿体基因组的主要特点是大多数植物含有反向重复（inverted repeat，IR）序列，长度 6～76 kb 不等。IR 序列被一个大单拷贝区（large single-copy region，LSC）和小单拷贝区（small single-copy region，SSC）隔开。也有些植物叶绿体基因组不含 IR，某些植物含随机重复（random repeat）序列。烟草叶绿体基因组的结构研究得较为清楚，全长 155 844bp（图 8-34），它的基因排列顺序被认为是陆生植物的代表。通过序列分析分析，不同植物的叶绿体基因组的组成是不完全相同的。

8.5.1.2 叶绿体的半自主性

叶绿体基因组平均含有 120kb 单拷贝序列，按照大约 1kb 相当一个基因估计，可编码 100 个左右的基因，包括编码蛋白质的基因、tRNA 基因、rRNA 基因等（表 8-3）。叶绿体基因中也含有内含子，但不同的植物叶绿体含内含子的情况不同，如高等植物中 6 个叶绿体 tRNA基因都含有内含子，但在藻类中却没有。

虽然叶绿体具有自身的遗传物质和进行蛋白质合成的全套机构，但是组成叶绿体的各种蛋白质成分是由核 DNA 和叶绿体 DNA 分别编码的。也就是说叶绿体的生长和增殖是由核 DNA 和叶绿体 DNA 共同控制的。

叶绿体自主性的表现在：叶绿体不仅有自己的 DNA，还有自己的核糖体，同原核生物的一样都是 70S，实验证明，缺少叶绿体核糖体的突变体不能合成质体基因组编码的蛋白质。

表 8-3 叶绿体基因组中编码的基因

基因类型	数量	基因类型	数量
编码 RNA		类囊体膜	
16S rRNA	1	光系统 I	2
23S rRNA	1	光系统 II	7
4.5S rRNA	1	细胞色素 b_6/f	3
5S rRNA	1	H^+-ATPase	6
tRNA	30	其他	
表达的基因		NADH 脱氢酶	6
r-蛋白质	19	铁氧还蛋白	3
RNA 聚合酶	3	RuBP 羧化酶	1
其他	2	未鉴定功能	29

虽然叶绿体有自己的 DNA，但是信息量有限，只能起部分控制作用。而大部分叶绿体的蛋白质是核基因编码，有些是叶绿体基因和核基因共同编码的。如 RuBP 羧化酶的 8 个大亚基是由叶绿体基因编码的，而 8 个小亚基是由核基因编码，在细胞质中合成后转运到叶绿体中。

8.5.2 叶绿体的发生和起源

关于叶绿体的起源，也同线粒体一样，有两种学说，但普遍接受内共生学说，认为叶绿体的祖先是蓝藻或光合细菌，在生物进化过程中被原始真核细胞吞噬，共生在一起进化成为今天的叶绿体（图 8-35）。

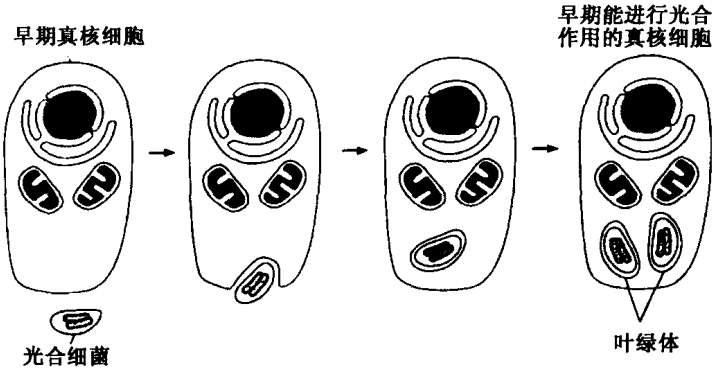


图 8-35 叶绿体的起源

叶绿体的起源被认为是光合作用细菌与已经含有线粒体的早期真核生物共生而来。

8.5.3 叶绿体与线粒体结构与功能的比较

叶绿体和线粒体都是真核细胞中与能量代谢相关的细胞器，有着相同的起源和增殖方式，并且都是半自主性细胞器。但二者在结构和功能上有很大差别。

在结构上，线粒体是双膜结构，有 2 个区室，而叶绿体是三膜结构，有 3 个区室（图 8-36）。

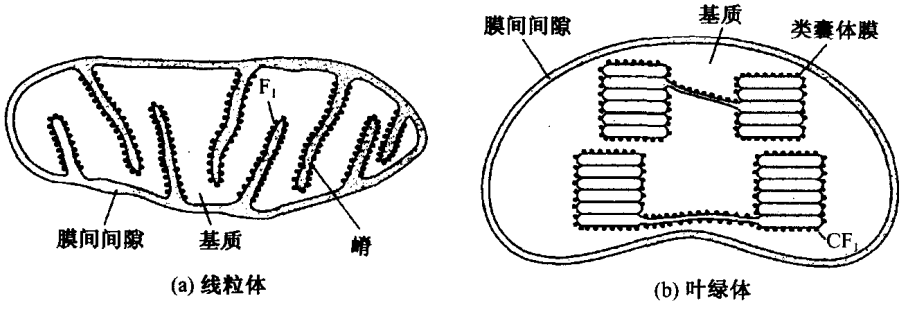


图 8-36 叶绿体与线粒体结构的比较

线粒体和叶绿体的膜和区室在结构组成和功能上都有所不同，如线粒体内膜除了作为线粒体界膜之外，主要功能是电子传递和合成 ATP。从结构上看，线粒体内膜向内折叠成嵴，ATP 合酶位于嵴上。而叶绿体的内膜只是稍向内折形成小管或小泡结构，且表面光滑。叶绿

体内膜是脂合成的场所，是叶绿体的界膜。线粒体、叶绿体膜和区室的主要结构和功能特征列于表 8-4。

在功能上，线粒体是有机物氧化的场所，同时将释放出的自由能转变成可利用的化学能储存在 ATP 的高能磷酸键上，这一过程是通过氧化磷酸化完成的。而叶绿体是光能的捕获者和高能有机物的制造者，光能的捕获和转化是通过光合作用完成的。二者功能虽然不同，但都是通过电子传递和建立 H^+ 质子梯度，实现能量转换的。

表 8-4　线粒体与叶绿体膜和区室的结构域功能比较

膜或区室	线粒体	叶绿体
外膜	标志酶：单胺氧化酶	
	厚 5.5nm，通透性强，有孔蛋白	厚 7nm，通透性强，有孔蛋白
内膜	标志酶：细胞色素氧化酶	
	蛋白质：脂≈0.7：0.3	蛋白质：脂≈0.9：1
	通透性差	通透性差
	向内折成嵴	稍向内折成管状或小泡状
	内表面有 ATP 合酶颗粒	内表面光滑
	有各种类型的运输蛋白	仅仅是运输交换蛋白
	是电子传递和氧化磷酸化部位	是脂合成的部位
类囊体膜	无	光反应的部位
		外表面有 CF_1 颗粒，光合磷酸化部位
膜间隙	标志酶：腺苷酸激酶	
	建立 H^+ 质子梯度	
基质	含有各种酶系、mtDNA、核糖体	含有一些酶、ctDNA、核糖体、
	tRNA 和蛋白质表达因子	tRNA 和蛋白质表达因子
	TCA 循环场所	卡尔文循环场所
类囊体腔	无	建立 H^+ 质子梯度
		水的光解

在质子梯度建立方面，二者有许多相似之处，也有一些差别。在叶绿体中，H^+ 是从叶绿体基质泵向类囊体腔，叶绿体基质中的 pH 是 8.0，建立 H^+ 质子梯度后，类囊体腔中的 pH 下降到 5.0。在线粒体中，H^+ 是从线粒体基质泵向膜间隙。线粒体基质的 pH 是 8.0，建立 H^+ 质子梯度后，膜间隙中 pH 为 7.0（图 8-37）。氧化磷酸化和光合磷酸化除了在 H^+ 质子梯度建立方面的一些差别之外，还有其他一些不同（表 8-5）。

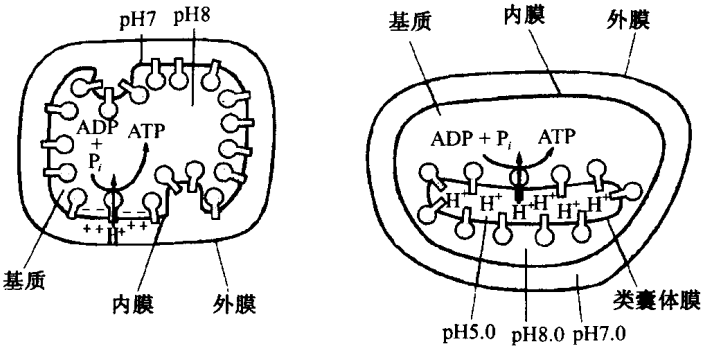


图 8-37　线粒体中 ATP 合酶的定向和 H^+ 的流向

表 8-5　氧化磷酸化与光合磷酸化的比较

	氧化磷酸化	光合磷酸化
细胞器部位	线粒体	叶绿体
	线粒体内膜	类囊体膜
电子传递系统	呼吸链	PSI、PSII
电子供体	NADH 或 $FADH_2$	H_2O 的光解
电子终受体	1/2 O_2	$NADP^+$
传递电子对	1 对	1 对
造成的 H^+ 质子浓度差	膜间间隙（高）/基质（低）	类囊体腔（高）/基质（低）
电子跨膜次数	3 次	2 次
偶联因子	F_0-F_1 ATP 合酶	CF_0-CF_1 ATP 合酶
机制	化学渗透	化学渗透
偶联因子定位取向	向内朝向基质	向外朝向基质
H^+ 质子流向	向外流向膜间隙	向内流向类囊体腔
产生 ATP 所需的 H^+	2 个 H^+	3 个 H^+

提　要

叶绿体由叶绿体被膜、类囊体和基质组成。类囊体分基粒类囊体和基质类囊体，是光合作用光反应的场所。

叶绿体的主要功能是进行光合作用，分两个阶段进行。光合作用的第一阶段是光反应，包括光能的吸收、电子的传递、光合磷酸化 3 个主要过程。

进行光吸收的功能单位是光系统，它由捕光复合物和光反应中心复合物组成，被吸收的光能在色素分子之间传递。

光反应的第二步是电子传递。这一过程中，H_2O 是原初电子供体，$NADP^+$ 是最终电子受体。电子载体位于类囊体膜上，包括细胞色素、铁氧还蛋白、$NADP^+$ 还原酶、质体蓝素、$NADP^+$、细胞色素 b/f 复合物等。

电子传递复合物包括光系统 I、光系统 II 和细胞色素 b/f 复合物。其中，光系统 II 又由捕光复合物 II、

PSII 反应中心复合物和水裂解放氧复合物组成，光系统 I 由捕光复合物 I 和 PS I 反应中心复合物组成。电子传递有环式和非环式两种途径。

叶绿体光合磷酸化的机制与线粒体的氧化磷酸化相似。在电子传递过程中，类囊体膜两侧建立质子动力势。光合磷酸化分为循环式光合磷酸化和非循环式光合磷酸化。

光合作用的第二阶段是 CO_2 的固定，即暗反应，在叶绿体基质中进行。光呼吸是一种依靠光来消耗 O_2，释放 CO_2 的作用。光呼吸作用的结果是降低了光合作用的效率。

叶绿体是半自主性细胞器，其基因组为环状，编码部分叶绿体所需的蛋白质和 RNA，大多数蛋白质由核基因编码并通过信号序列转运而来。

叶绿体是由原质体分化来，并通过分裂而增殖。

9 内膜系统与蛋白质分选和膜运输

真核细胞在进化上一个显著特点就是形成了发达的细胞质膜系统（cytoplasmic membrane system），将细胞内环境分割成许多功能不同的区室（compartment）。虽然这些区室具有各自独立的结构和功能，但它们又是密切相关的，尤其是它们的膜结构是相互转换的，转换的机制则是通过蛋白质分选（protein sorting）和膜运输（membrane traffic）实现的（图 9-1）。

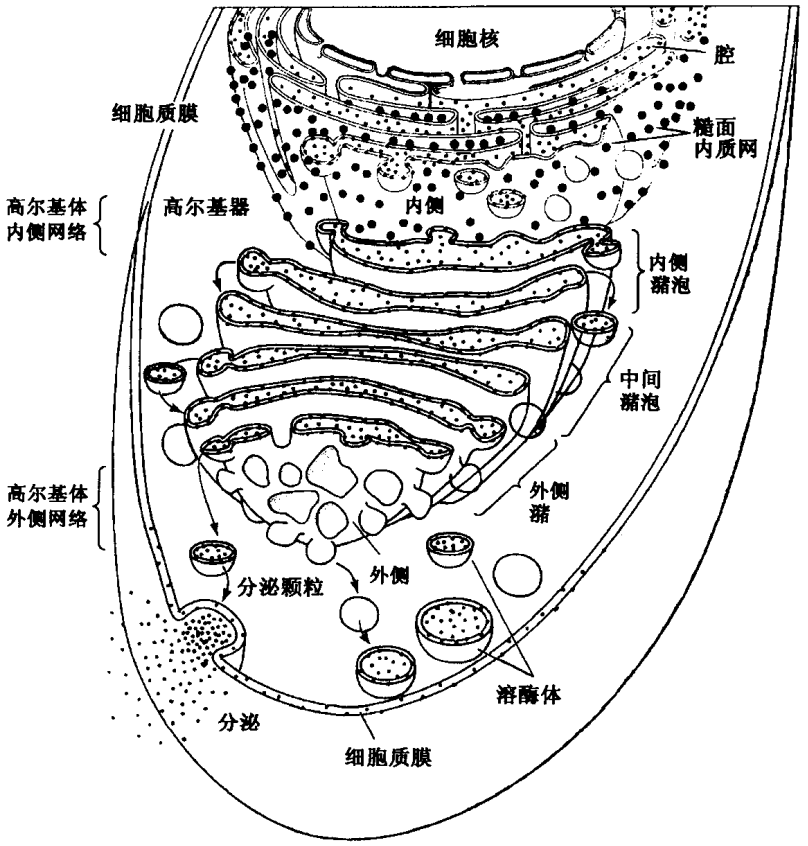


图 9-1 内膜系统和膜运输（引自 Voet *et al*.，1995）
细胞内有许多膜结合区室（membrane-bound compartment），包括细胞核、内质网、高尔基体、溶酶体、内体和分泌泡等。

9.1 细胞质膜系统及其研究方法

9.1.1 膜结合细胞器与内膜系统

关于真核细胞中具有膜结构的细胞器的总体描述通常有 3 个概念：膜结合细胞器（mem-

brane-bound organelle）或膜结合区室、细胞质膜系统、内膜系统（endomembrane system）。虽然这 3 个概念都是指真核细胞中具有膜结构的细胞器，但是在含义上仍有一些差别。膜结合细胞器统指细胞质中所有具有膜结构的细胞器，包括细胞核、内质网、高尔基体、溶酶体、分泌泡、线粒体、叶绿体和过氧化物酶体等。细胞质膜系统是指细胞内那些在生物发生上与质膜相关的细胞器，显然不包括线粒体、叶绿体和过氧化物酶体，因为这几种细胞器的膜是逐步长大的，而不直接利用质膜。而内膜系统是指内质网、高尔基体、细胞核、溶酶体和液泡（包括内体和分泌泡）5 类膜结合细胞器，因为它们的膜是相互流动的，处于动态平衡，在功能上也是相互协同的。

也有学者认为，广义上的内膜系统概念也包括线粒体、叶绿体、过氧化物酶体、细胞核等细胞内所有膜结合的细胞器。

9.1.1.1 膜结合细胞器的种类和功能

原核细胞内只有一个区室就是胞质溶胶（cytosol）。真核细胞内有许多膜结合的区室，尽管它们在细胞内所占的比例很小（表 9-1），它们有着许多不同的功能（表 9-2）。

表 9-1 肝细胞中主要膜结合细胞器的体积比

细胞器	每细胞所含数量/个	体积比/%
胞质溶胶	1	54
线粒体	1700	22
内质网	1	12
细胞核	1	6
高尔基体	1	3
过氧化物酶体	400	1
溶酶体	300	1
内体	200	1

表 9-2 真核细胞膜结合区室的主要功能

细胞器（区室）	主要功能
胞质溶胶	代谢的主要场所，是蛋白质合成部位
细胞核	基因组存在场所，DNA 和 RNA 的合成地
内质网	大多数脂的合成场所，蛋白质合成和集散地
高尔基体	蛋白质和脂的修饰、分选和包装
溶酶体	细胞内的降解作用
内体	内吞物质的分选
线粒体	通过氧化磷酸化合成 ATP
叶绿体	进行光合作用
过氧化物酶体	毒性分子的氧化

在这些膜结合的细胞器中，线粒体、叶绿体、过氧化物酶体和细胞核等的独立性很强，并且有特别的功能，其他几种膜结合细胞器，如内质网、高尔基体、溶酶体和液泡，虽然有不同的结构和功能，但是它们都参与蛋白质的加工、分选和膜泡运输，形成了一个特别的细胞内系统。

膜结合细胞器在细胞内的分布是有层次的（图 9-2），细胞核位于细胞的中央，它是细胞中最重要的细胞器，有两层膜结构。细胞核的外膜与内质网的膜是联系在一起的，细胞核的外膜是糙面内质网的一部分。由于内质网与核外膜相连，所以内质网位于细胞核的外侧，高尔基体靠近细胞核，但在内质网的外侧，接受来自内质网的蛋白质和脂肪，然后对它们进行修饰和分选。溶酶体是含有水解酶的囊泡，它是由高尔基体分泌而来。内体是由内吞作用产生的具有分选作用的细胞器，它能向溶酶体传递从细胞外摄取的物质，这种细胞器一般位于细胞质的外侧。另外还有线粒体、过氧化物酶体等分布在细胞的不同部位。如果是植物细胞还有叶绿体和中央液泡。

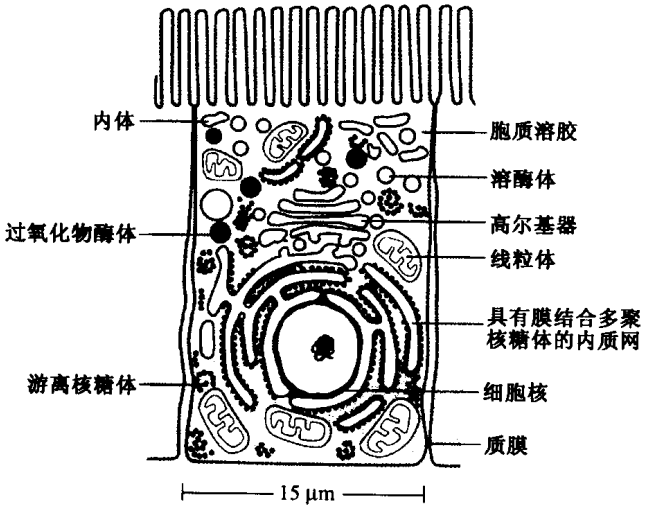


图 9-2　动物细胞中膜结合的细胞器（引自 Alberts *et al*., 1994）
细胞内的空间为胞质溶胶，里面被一些膜结合的细胞器分隔成许多区室，每个区室至少有一层单位膜包裹，如细胞核、高尔基体、内质网、溶酶体、线粒体等。

9.1.1.2　内膜系统的动态性质

虽然内膜系统中各细胞器是一个个封闭的区室，并各具一套独特的酶系，有着各自的功能，在分布上有各自的空间。实际上，内膜系统中的结构是不断变化的，内膜系统的最大特点是动态性质，各种膜结构处于流动状态。正是这种流动状态，将细胞的合成活动、分泌活动和内吞活动连成了一种网络，在各内膜结构之间常常看到一些小泡来回穿梭，这些小泡分别是从内质网、高尔基体和细胞质膜上产生的，这就使内膜系统的结构处于一种动态平衡（图 9-3）。

内膜系统中的动态网络主要是由细胞中 3 种不同的生化活动及 3 种不同的代谢途径造成的。①生化合成途径（biosynthetic pathway）：在动物细胞中主要涉及分泌性蛋白质分选的合

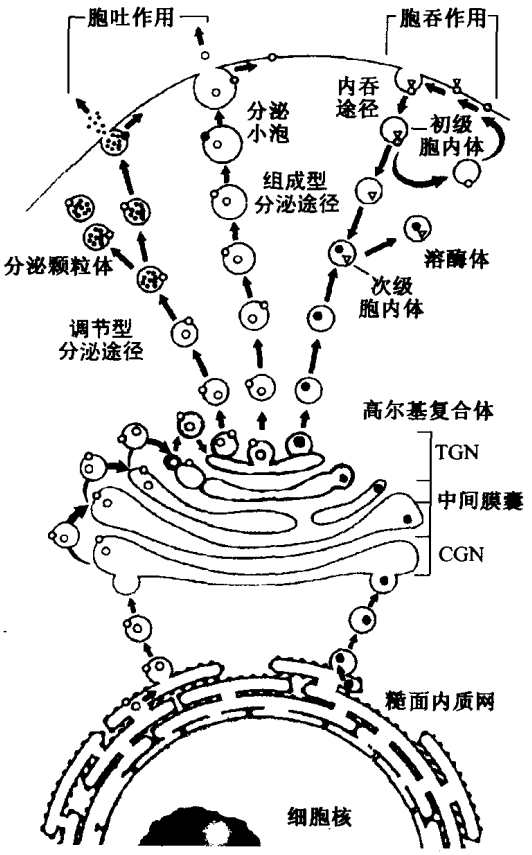


图 9-3 真核细胞中生化合成、分泌和内吞作用的动态网络（引自 Karp, 1996）
内膜系统将细胞中的生化合成、分泌和内吞作用连接成动态的、相互作用的网络。在内质网合成的蛋白和脂通过分泌活动进入分泌小泡运送到工作部位（包括细胞外）；细胞通过内吞途径将细胞外的物质送到溶酶体降解。

成与脂的合成和加工。脂的合成在光面内质网，而分泌性蛋白质的合成起始于糙面内质网，完成于高尔基体。②分泌途径（secretory pathway）：在内质网上合成的蛋白质和脂经出芽形成小泡逐步向外运输传递。细胞的分泌活动分为两种类型：组成型和调节型，前者恒定释放分泌物，后者需要信号激发。③内吞途径（endocytosis pathway）：是分泌的相反过程，是将细胞外的物质吞进内体和溶酶体。

内膜系统参与的动态运输活动酷似人类社会的生产活动，而内膜系统是蛋白质合成、分泌及外来物质降解的处理中心，任何时候观察都是车水马龙，一派繁忙景象。

9.1.1.3 膜结合细胞器的进化及其意义

合成的蛋白质和脂类要及时地运抵各部位。真核生物的内膜系统是如何进化的？一般认为现代的真核生物是由古代的原核生物进化而来的。古代的原核生物体积小，内部结构简单，仅有细胞质膜而没有其他的膜结构，细胞质膜担负着所有与膜有关的功能，包括质子泵、ATP 的合成、蛋白质的分泌以及脂肪的合成等。由于古代细菌的体积小，表面积与体积的比值很大。现今的真核生物其体积大约是典型的细菌 *E. coli* 的 1 000 到 10 000 倍，体积的增

大，势必要求表面积的增大才能维持合适的体积与表面积的比值。

真核细胞的膜结合细胞器的进化有两种途径，一种是线粒体和叶绿体的进化模式，即内共生途径。对于内膜系统来说，则是通过细胞质膜的内陷分化途径形成的。

图 9-4 是关于核膜和内质网膜进化的可能途径的假说。细菌中的 DNA 是同膜结合在一起的，通过质膜的内陷将 DNA 包裹在一个膜结构中，并逐渐形成两层核膜。在古代的细菌中一些核糖体也是附着在质膜上，随着质膜的内陷和核膜的形成，核糖体就结合在核膜的外膜上逐渐进化形成内质网。这一模型较好地说明了为什么核膜是双膜结构，而且在外膜上有核糖体的存在。

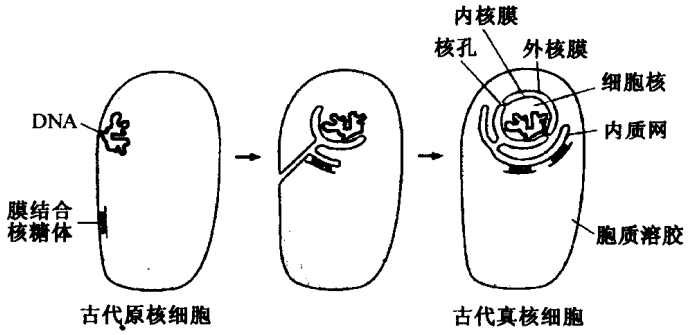


图 9-4　核膜和 ER 膜进化的可能途径

在细菌中，DNA 分子结合在质膜上，同时还有一些膜结合的核糖体。在进化过程中，细菌的质膜有可能内陷，附着在质膜上的 DNA 也随之内陷，逐渐形成了双层的完全将 DNA 包被起来的核膜。然后核被膜逐渐形成核孔以便直接与胞质溶胶进行通讯。某些质膜逐渐形成内质网，并有核糖体附着。

细胞质中各种膜结合细胞器的进化，特别是内膜系统的形成对于细胞的生命活动具有十分重要的意义。首先是内膜系统中各细胞器膜结构的合成和装配是统一进行的，这不仅提高了合成的效率，更重要的是保证了膜结构的一致性，特别是保证了膜蛋白在这些膜结构中方向的一致性。其次是内膜系统在细胞内形成了一些特定的功能区域和微环境，如酶系统的隔离与衔接、细胞内不同区域形成 pH 值差异、离子浓度的维持、扩散屏障和膜电位的建立等等，以便在蛋白质、脂类、糖类的合成代谢、加工修饰、浓缩过程中完成其特定的功能。第三，内膜系统通过小泡分泌的方式完成膜的流动和特定功能蛋白质的定向运输，这不仅保证了内膜系统中各细胞器的膜结构的更新，更重要的是保证了一些具有杀伤性的酶类在运输过程中的安全，并能准确迅速到达作用部位。第四，细胞内的许多酶反应是在膜上进行的，内膜系统的形成，使这些酶反应互不干扰。第五，扩大了表面积，提高了表面积与体积的比值。第六，区室的形成，相对提高了重要分子的浓度，提高了反应效率。

9.1.2　内膜系统与蛋白质分选

蛋白质不仅是细胞各种结构和细胞器的结构分子，也是细胞生命活动的功能分子。蛋白质是由核糖体合成的，合成之后必须准确无误地运送到细胞的各个部位。由于各个部位所需蛋白质在结构和功能方面各不相同，为了能准确地运送蛋白质，在进化过程中每种蛋白质形

成了一个明确的地址签（address target），细胞通过对蛋白质地址签的识别进行运送，这就是蛋白质分选。在线粒体一章中简要介绍了蛋白质分选的两种方式：共翻译运输和翻译后运输，内膜系统参与共翻译运输，是分泌蛋白质分选的主要系统。

分泌蛋白的分选是由内膜系统特定膜部位的受体蛋白促进的，这些受体蛋白结合具有特定地址签的蛋白质，并将它们装入正确的运输小泡。而那些没有地址签的蛋白质被装入非特异性运输小泡。

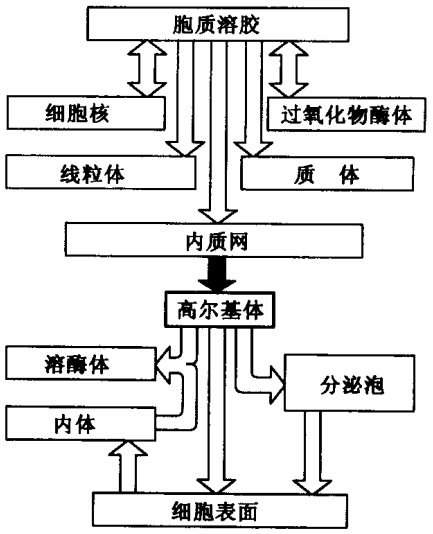


图 9-5　细胞质中蛋白质合成和空间定位路线
（引自 Alberts *et al*., 1994）

细胞中各部位（包括细胞质）中的蛋白质都是来自胞质溶胶，不过内质网以上的细胞器，包括细胞核、线粒体、过氧化物酶体和质体所需蛋白是由胞质溶胶直接运送的。而从内质网以下的各种细胞器，包括内质网、高尔基体、溶酶体、内体、分泌泡、细胞质膜以及细胞外基质等所需的蛋白质虽然起始于胞质溶胶，但要经过内质网和高尔基体的中转。

在细胞生命周期的各个阶段都需要不断补充和更新蛋白质（或酶）。细胞中的线粒体、叶绿体和过氧化物酶体等细胞器都是通过已存在细胞器的分裂增殖的，新形成的细胞器的生长需要大量的蛋白质。细胞本身也是通过分裂增殖的，新形成的细胞为了增大体积，需要不断地补充蛋白质。即使是不进行分裂的细胞，由于细胞内蛋白质的寿命限制和降解，也需要不断地补充蛋白质，以取代细胞器中丧失功能的蛋白质，所以蛋白质的合成和分选运输是细胞中最重要的生命活动之一。

9.1.2.1　蛋白质分选定位的时空概念

所谓蛋白质分选定位的时空概念包括两种含义：①合成的蛋白质何时转运？②合成蛋白质在细胞中定位空间及转运中所要逾越的空间障碍是什么？

细胞中的蛋白质除了极少数是由线粒体或叶绿体编码之外，大多是由核基因编码，并在细胞质核糖体中合成。从时间上考虑，蛋白质的合成分选有两种情况：先合成，再分选和一边合成一边分选。为了适于蛋白质分选的时间上的需要，核糖体在合成蛋白质时就有两种存在状态：游离的或与内质网结合的。

从蛋白质定位的空间看，包括了细胞内各个部分，即使是具有蛋白质合成机器的线粒体和叶绿体也需要从细胞质中获取所需蛋白质（图 9-5）。

9.1.2.2　蛋白质分选定位的空间障碍及克服机制

从蛋白质定位的细胞内空间部位来看，可分为 3 种类型：①没有膜障碍的，如胞质溶胶，包括胞质溶胶中的细胞骨架蛋白和各种酶及蛋白质分子。②有完全封闭的膜障碍，如线粒体、叶绿体、过氧化物酶体、内质网、高尔基体、溶酶体、内体等。由于运送到细胞质膜和细胞外的蛋白质要逾越内质网和高尔基体的膜障碍，所以也归于此类。③有膜障碍，但是膜上有孔，如细胞核。

由于蛋白质定位的空间障碍不同，蛋白质定位运输的机制也就不同。胞质溶胶中合成的蛋白质，可以 3 种不同的运输方式将蛋白质定位到不同的膜结合细胞器（图 9-6）。

核孔运输（transport through nuclear pore）　胞质溶胶中合成的蛋白质穿过细胞核内外膜形成的核孔进入细胞核。核孔运输又称为门运输，核孔如同一扇可开启的大门，而且是具有选择性的门，能够主动运输特殊的生物大分子。

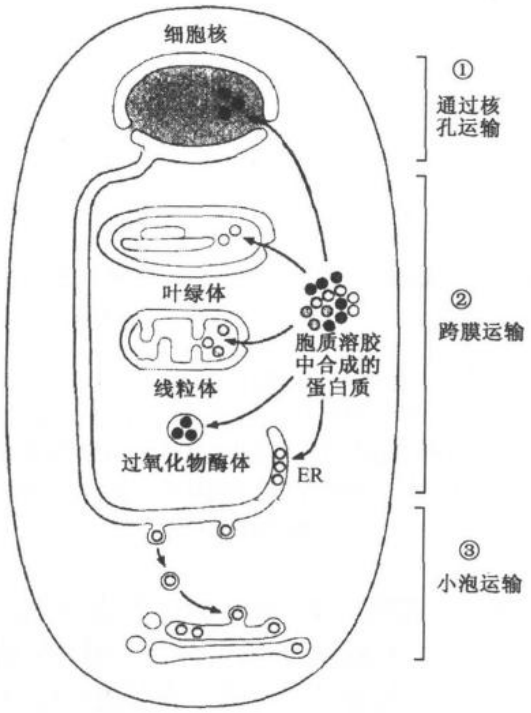


图 9-6　膜结合细胞器的三种运输机制（引自 Alberts *et al*., 1994）
蛋白质在核孔运输和小泡运输中可保持折叠的形式，但在跨膜运输中必须解折叠，定位后再进行折叠。
无论是何种运输方式都需要消耗能量。

跨膜运输（across membrane transport）　胞质溶胶中合成的蛋白质进入到内质网、线粒体、叶绿体和过氧化物酶体等则是通过跨膜机制进行运输，需要蛋白质运输蛋白（protein translocator）的帮助。被运输的蛋白质通常是未折叠的状态，细菌的质膜上也有类似的运输蛋白。

小泡运输（vesicle translocation）　蛋白质从内质网转运到高尔基体以及从高尔基体转运到溶酶体、分泌泡、细胞质膜、细胞外等则是由小泡介导的，这种小泡称为运输小泡（transport vesicle）。内膜系统的蛋白质定位，除了内质网本身之外，其他膜结合细胞器的蛋白质定位都是通过形成运输泡，将蛋白质从一个区室转运到另一个区室。小泡的形成是通过出芽的方式，到达目的地时则是通过膜融合的方式使小泡成为另一个区室的一个部分，实现蛋白质的运输。在这个过程中不仅运输了小泡内的蛋白质，同时也将膜脂和膜蛋白从一个区室运到了另一个区室。

9.1.2.3 信号序列指导蛋白质的正确运输

虽然蛋白质可通过不同的方式和机制克服空间障碍定位到膜结合的细胞器中，但就其定位的准确性来说，无论何种运输机制都是通过信号引导实现的，换句话说，信号序列决定蛋白质的正确运输方向（图 9-7）。

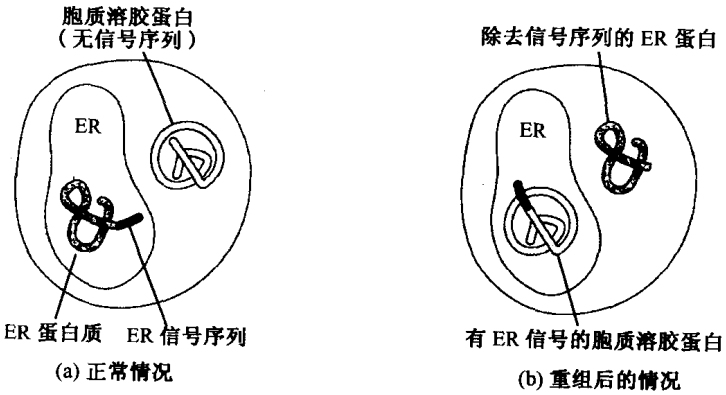


图 9-7 信号序列在蛋白质分选中的作用（引自 Alberts *et al*., 1994）

(a) 具有 ER 定位信号序列的蛋白质被运输到 ER 中，而没有信号序列的蛋白质存在于胞质溶胶中；(b) 通过重组 DNA 技术将信号序列与胞质溶胶的蛋白质基因重组，表达的胞质溶胶蛋白被定位到 ER，相反，被剥夺了 ER 定位信号的蛋白质则只能存在于胞质溶胶中。该实验说明信号序列对所引导的蛋白质没有特异性。

信号序列通常为 15～60 个氨基酸长度，位于新生肽的 N 端。通过基因工程的方法证明信号序列指导的蛋白质运输和定位对蛋白质没有特异性，但不同的膜结合细胞器具有不同的蛋白质定位的信号序列（表 9-3）。信号序列完成了指导蛋白质运输任务之后常常要被切除（并非都是如此）。

表 9-3 细胞内某些典型蛋白质运输信号及功能

功　能	信号序列组成
输入内质网	$^{+}H_3N$-Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser-Leu-Leu-Leu-Val- Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala-Thr-Glu-Ala-Glu-Gln-Leu-Thr- Lys-Cys-Glu-Val-Phe-Gln
滞留内质网	-Lys-Asp-Glu-Leu-COO^{-}
输入线粒体	$^{+}H_3N$-Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe- Phe-Lys-Pro-Ala-Thr-Arg-Thr-Leu-Cys-Ser-Ser-Arg-Tyr-Leu-Leu-
输入细胞核	-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-
输入过氧化物酶体	-Ser-Lys-Leu-

注：$^{+}H_3N$ 代表氨基端；COO^{-} 代表羧基端。

根据信号序列运输方向的不同分为 3 种类型，即入核信号、引导肽和信号肽。入核信号指导核蛋白的运输，引导肽指导线粒体、叶绿体和过氧化物酶体蛋白的运输，信号肽则指导内膜系统的蛋白质运输。引导肽指导的蛋白质运输已在线粒体和叶绿体中进行了介绍，入核

信号将在细胞核一章中讨论，本章将重点讨论信号肽指导的蛋白质运输定位。

9.1.3 内膜系统的研究方法

虽然电子显微镜能够获得高度清晰的细胞内膜系统的结构，但是不能研究单个膜结合细胞器的结构和功能。最有效的是离心分离技术、同位素示踪技术和突变技术。特别是 3 位科学家使用分离技术揭示了内膜系统的结构和功能，即动态特性，从而分享了 1974 年诺贝尔奖：Claude 发明了用于细胞器分离的差速离心技术；Palade 用这一技术研究了内质网和高尔基体；de Duve 用离心分离技术发现了溶酶体和过氧化物酶体。

9.1.3.1 放射自显影术

胰腺系统中胰泡细胞具有最发达的内膜系统，主要功能是合成消化酶类。这些酶类合成之后要从胰腺系统经由导管分泌到小肠中行使功能。这些酶是如何分泌出去的？Jamieson 和 Palade 使用放射自显影技术得到了答案（图 9-8）。

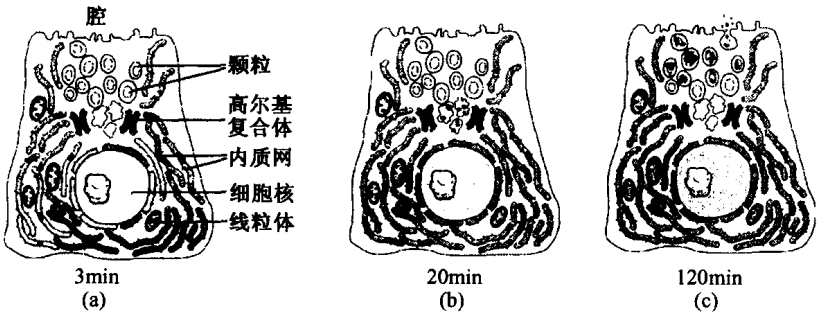


图 9-8 蛋白质分泌的同位素示踪实验（引自 Wolfe，1993）
(a) 细胞与同位素接触 3min 之后，标记物出现在内质网中；(b) 细胞接触同位素 3min 后，置于非同位素的培养基中“跟踪”17min，放射性标记出现在高尔基体和部分分泌泡；(c) 细胞接触同位素 3min 后，置于无同位素的培养基中“跟踪”117min，标记物主要出现在分泌泡中。

他们将一小块胰腺组织放在加有放射性同位素标记氨基酸的培养液中进行短暂培养，在此期间，活细胞就会摄取具有放射性的氨基酸并掺入到核糖体合成的消化酶中，然后立即将组织进行固定，通过切片和放射自显影检测，发现放射性出现在内质网，说明蛋白质的合成始于内质网。为了检查蛋白质合成后的运输路线，他们还进行了一系列脉冲追踪实验（pulse-chase experiment），即将组织置于加有放射性同位素标记氨基酸的培养液中进行短暂培养，然后将组织洗净再置于无同位素的培养基中培养不同时间再进行组织固定和放射自显影术检测。检测的结果表明：追踪培养的时间越长，同位素标记的蛋白质离开合成部位越远，分泌性蛋白质在内质网合成后经高尔基体转移到分泌小泡和细胞外。

9.1.3.2 差速离心分离与功能分析

虽然放射自显影技术证明了分泌性蛋白质合成的起始部位，但不能证明合成分泌性蛋白质是何种细胞器。20 世纪 50～60 年代 Claude 和 de Duve 发展了细胞组分分离技术，分离到

了具有蛋白质合成和分泌功能的结构。当细胞被匀浆破碎时，细胞质膜（包括细胞质膜系统的膜）破裂成膜碎片，破裂的膜碎片能够自己融合形成球形的小囊泡。这些小囊泡的直径大约 100nm 左右，分别来自于不同的膜结合细胞器（细胞核、线粒体、质膜、内质网等）。这些小囊泡具有不同的性质，可以通过细胞离心分离技术将它们分开（图 9-9）。来自于内膜系统的小囊泡（主要是内质网和高尔基体）是一种异质性的集合体，其大小相似，称之为微粒体（microsome）。有些微粒体表面具有一些小颗粒附着，有些表面没有小颗粒的附着，用更精确的技术能够将这些不同的颗粒分开。

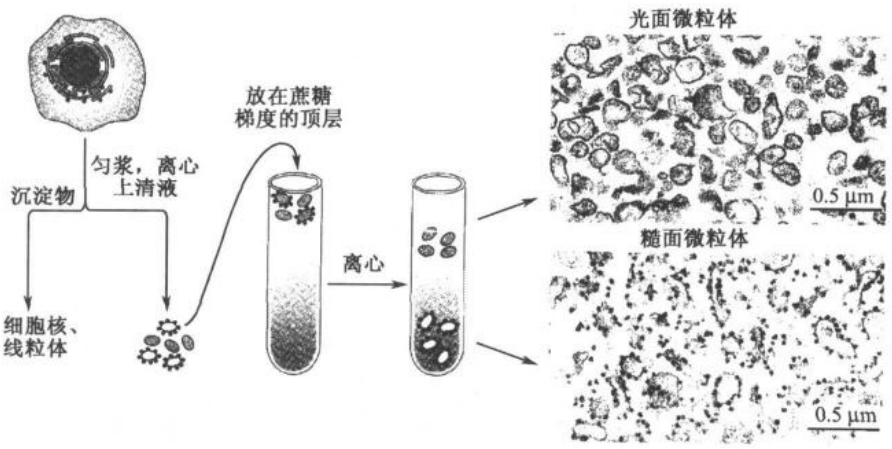


图 9-9　通过差速离心分离微粒体（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）
用机械匀浆将细胞破碎，各种膜细胞器破碎，并且重新自我融合形成各种球形膜泡，通过较高速度离心除去细胞核、线粒体、过氧化物酶体等细胞器。收集悬浮液再用较低速度离心，然后用电子显微镜检查离心后分开的两部分结构。发现上层的囊泡表面是光滑的，沉淀下的囊泡表面有核糖体颗粒。

通过差速离心分离的微粒体不仅具有膜的结构特征，同时还具有在活细胞中的生物活性和功能。如来自高尔基体的囊泡具有将蛋白质和脂进行糖基化修饰的作用。用从这些囊泡中分离的特殊蛋白质作为抗原制备抗体，然后将制备的抗体与特定的颗粒如金颗粒结合，再通过免疫电镜技术就能够对用作抗原的酶进行定位，通过这些研究详细揭示了高尔基体在复杂的糖装配中的具体作用。

9.1.3.3　用突变体研究内膜系统的运输作用

科学家利用酵母突变体研究分泌过程及与分泌相关的基因，揭示了小泡运输的过程（图 9-10）。为了研究编码与分泌途径相关蛋白质的基因，科学家们筛选了一些突变体，在这些突变体中，内膜结构不正常。如涉及 ER 出芽小泡形成的基因发生突变，这种酵母的 ER 就特别大；如涉及与高尔基体融合的基因突变，这种突变酵母中积累大量的分泌泡。目前已经分离和克隆了几十个与分泌途径相关的基因。通过序列分析，表明这些基因与哺乳动物分泌基因具有同源性，推测哺乳动物的细胞分泌过程与酵母细胞的分泌过程相似。

9.2　内　质　网

内质网（endoplasmic reticulum，ER）是由 Porter 和 Claude 等在 1945 年发现的。他们在

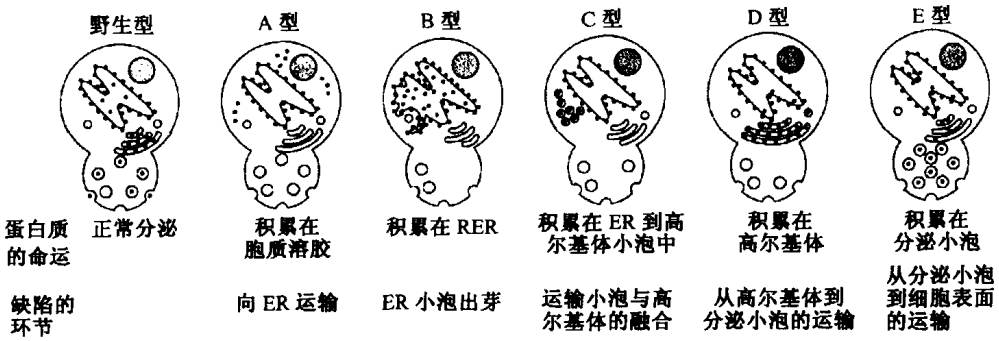


图 9-10　与分泌相关的不同酵母突变体（引自 Lodish *et al*., 1999）
野生型是分泌正常的酵母，A、B、C、D、E 是 5 类不同的分泌基因（secretory gene）突变，代表了蛋白质分泌的 5 个过程。A：分泌蛋白质不能进入内质网；B：内质网出芽缺陷；C：分泌小泡不能与高尔基体融合；D：高尔基体不能形成分泌泡；E：分泌泡不能与质膜融合。

体外培养成纤维细胞时得到了薄层生长细胞，这种培养的细胞不需要进行切片就可以在电子显微镜下进行观察，从而得到第一张培养细胞的电镜照片。观察发现薄层生长细胞的细胞质不是均质的，其中可见有一些形状和大小略有不同的网状结构，并集中在内质中，所以建议称作内质网。原核生物没有内质网，由细胞质膜代行其功能。

9.2.1　形态结构和化学组成

9.2.1.1　*形态结构*

内质网是由一层单位膜形成的囊状、泡状和管状结构，并形成一个连续的网膜系统。由于它靠近细胞质的内侧，故称为内质网（图 9-11）。膜厚 50～60Å，内腔是连通的。内质网通常占有细胞膜系统的一半左右，占细胞体积的 10% 以上。内质网在细胞质中一般呈连续的网状，但这种连续性和形状不是固定不变的。在细胞周期中，一个时期可能是一些连续的小管或小囊泡，而在另一个时期有可能是不连续的。同时，内质网对细胞的生理变化相当敏感，在不正常或服药的情况下，如饥饿、缺氧、辐射、患肝炎、服用激素等，均可使肝细胞的 ER 囊泡化。

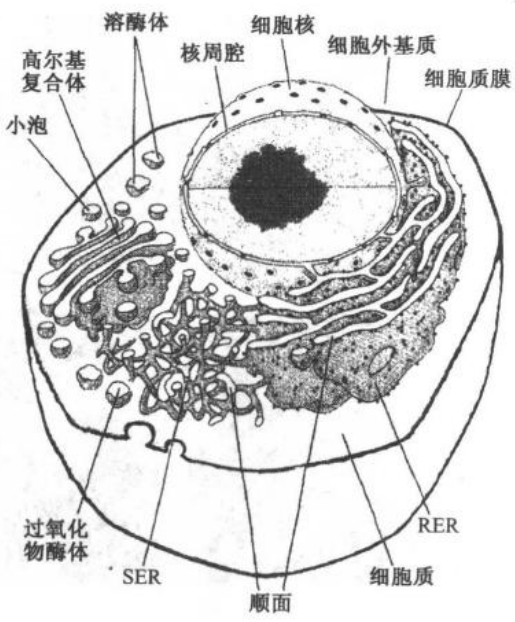


图 9-11　细胞中内质网与细胞核、高尔基体的立体结构（引自 Becker *et al*., 1996）

根据内质网上是否附有核糖体，将内质网分为两类：糙面内质网（rough endoplasmic reticulum，RER）和光面内质网（smooth endoplasmic reticulum，SER）。由于内质网是一种封闭的囊状、泡状和管状

结构，它就有两个面，内质网的外表面称为胞质溶胶面（cytosolic surface），内表面称为潴泡面（cisternal surface）。

糙面内质网多呈大的扁平潴泡，在电镜下观察排列极为整齐（图 9-12a）。它是核糖体和内质网共同构成的复合结构，普遍存在于合成分泌蛋白的细胞中；越是分泌旺盛的细胞（如浆细胞）越多，未分化和肿瘤细胞中较少。其主要功能是合成分泌蛋白、多种膜蛋白和酶蛋白。糙面内质网与细胞核的外层膜相连通。

无核糖体附着的内质网称为光面内质网（图 9-12b），通常为小的管状和小的泡状，而非扁平状，广泛存在于各种类型的细胞中，包括合成胆固醇的内分泌腺细胞、肌细胞、肾细胞等。光面内质网是脂类合成的重要场所，它往往作为出芽的位点，将内质网上合成的蛋白质或脂类转运到高尔基体。

光面内质网和糙面内质网在细胞中的分布是不同的，有的细胞中只有 RER，如胰腺外分泌细胞；有的细胞只有 SER，如平滑肌、横纹肌细胞；有的细胞中既含有 RER，又含有 SER。据估计，大鼠肝细胞中内质网蛋白质大约占总蛋白质的 20%，内质网中脂占总脂的 50%。

另外还有两个概念：微粒体和肌质网，可将它们看成是特殊类型的内质网。

微粒体。在细胞匀浆和差速离心过程中获得的由破碎的内质网自我融合形成的近似球形的膜囊泡状结构，它包含内质网膜和核糖体两种基本成分。在体外实验中，具有蛋白质合成、蛋白质糖基化和脂类合成等内质网的基本功能。

肌质网（sarcoplasmic reticulum）。心肌和骨骼肌细胞中的一种特殊的内质网，其功能是参与肌肉收缩活动。肌质网膜上的 Ca^{2+}-ATP 酶将细胞基质中的 Ca^{2+} 泵入肌质网中储存起来，使肌质网 Ca^{2+} 的浓度比胞质溶胶高出几千倍。受到神经冲动刺激后，Ca^{2+} 释放出来，参与肌肉收缩的调节。

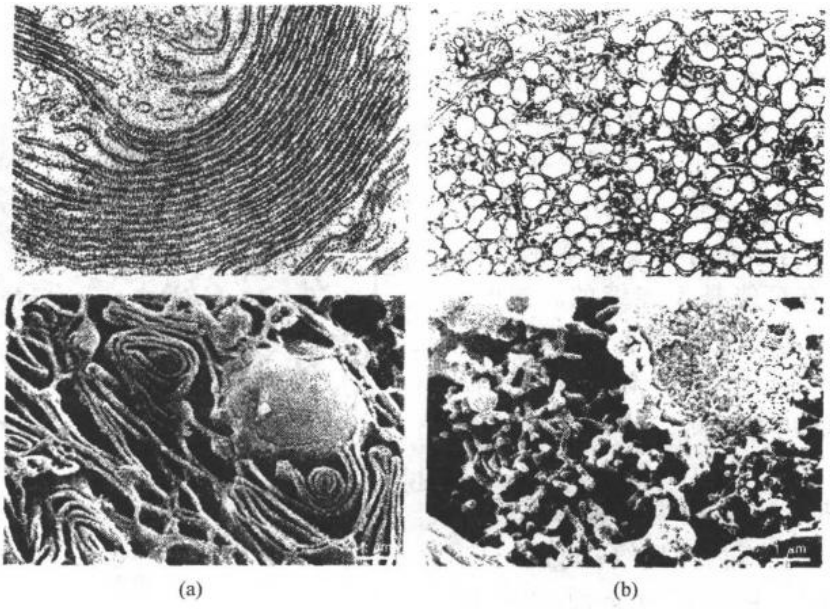


图 9-12　超薄和扫描电镜观察的内质网（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）
(a) 糙面内质网；(b) 光面内质网。上半部是超薄电镜照片，下半部是扫描电镜照片。

9.2.1.2 内质网的化学组成和酶类

内质网是膜囊结构，所以构成内质网的主要化学成分是蛋白质和脂。内质网膜的化学组成与线粒体外膜很相似，磷脂占 50%～60%，蛋白质约占 20%。在磷脂中：磷脂酰胆碱占 55%～58%；磷脂酰乙醇胺占 20%～25%；磷脂酰肌醇及磷脂酰丝氨酸占 5%～10%；鞘磷脂占 4%～7%。

通过对分离的微粒体小泡膜的生化分析，发现存在许多与糖代谢、脂代谢、蛋白质加工、药物及其他有毒物质脱毒相关的酶类（表 9-4）。主要有 NADPH-细胞色素 P450 还原酶、NADPH-细胞色素 b_5 还原酶、细胞色素 b_5、细胞色素 P450、脂肪酸 CoA 连接酶、胆固醇羟基化酶等。虽然微粒体可来自内膜系统的各种膜结合细胞器，但通过功能分析，上述的 4 类酶主要存在于内质网膜。

细胞色素 P450 在内质网膜中最为丰富，占微粒体膜蛋白的 10%，是跨膜蛋白。它是内质网电子传递链中的一个组成部分，这条电子传递链中还含有 NADPH-细胞色素 P450 还原酶和磷脂酰胆碱。参与这一电子转移的另一种重要的酶是细胞色素 b_5，它也是还原酶，含有 NADH。

内质网的标志酶是葡萄糖-6-磷酸酶。

表 9-4 在分离的微粒体膜上检测到的某些酶类

催化类型	酶	作用位点朝向
糖代谢	葡萄糖-6-磷酸酶	腔
	β-葡糖醛酸酶	腔
	葡糖醛酸基转移酶	腔
	糖基转移酶	胞质溶胶
脂代谢	脂肪酸 CoA 连接酶	胞质溶胶
	磷脂酸磷酸酶	胞质溶胶
	胆固醇羟基化酶	胞质溶胶
	转磷酸胆碱酶	胞质溶胶
	磷脂转位酶	胞质溶胶和腔
与药物脱毒相关的氧化酶	细胞色素 P450	胞质溶胶
	NADPH-细胞色素 P450 还原酶	胞质溶胶
	细胞色素 b_5	胞质溶胶
	NADH-细胞色素 b_5 还原酶	胞质溶胶
蛋白质的加工	蛋白质二硫键异构酶	腔

9.2.2 光面内质网的功能

光面内质网具有很多重要的功能，如类固醇激素的合成、肝细胞的脱毒作用、糖原分解释放葡萄糖、肌肉收缩的调节等。

9.2.2.1 糖原分解释放游离的葡萄糖

内质网中的葡萄糖-6-磷酸酶能够催化 6-磷酸葡萄糖水解生成葡萄糖和磷酸。肝细胞的一个重要功能是维持血液中葡萄糖水平的恒定，这一功能与葡萄糖-6-磷酸酶的作用密切相关。

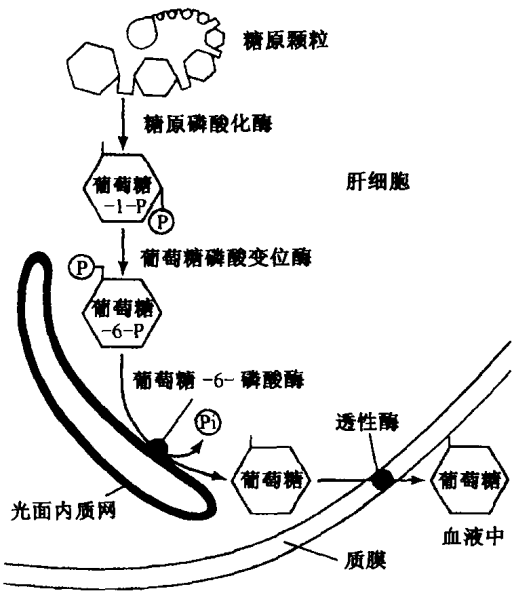


图 9-13　光面内质网在糖原裂解中的作用
（引自 Becker *et al*., 1996）

肝细胞是以糖原颗粒的形式储存葡萄糖，肝细胞光面内质网的胞质溶胶面附着有糖原颗粒，当肌体需要葡萄糖时，糖原即被降解。肝细胞中的糖原降解是受激素控制的，激素作为信号分子激发 cAMP 的浓度升高，然后由 cAMP 激活蛋白激酶 A，蛋白激酶 A 能够激活将糖原水解生成葡萄糖-1-磷酸的酶。由于葡萄糖-1-磷酸不能够通过扩散穿过细胞膜进入血液，需要先转变成葡萄糖-6-磷酸，然后由光面内质网中的葡萄糖-6-磷酸酶将葡萄糖-6-磷酸水解生成葡萄糖和磷酸，释放游离的葡萄糖进入血液作为化学能供细胞使用（图9-13）。

9.2.2.2　类固醇激素的合成

分泌类固醇激素的细胞如肾上腺细胞、睾丸间质细胞和黄体细胞都有丰富的光面内质网，并在光面内质网上含有合成胆固醇和转化胆固醇为激素的全套酶系，所以光面内质网能够合成胆固醇，然后将胆固醇氧化、还原、水解进一步转变成各种类固醇激素。类固醇激素的合成涉及多个途径中的酶，包括存在于胞质溶胶和光面内质网中的酶类。但是合成的起始物质是胆固醇前体物质甲羟戊酸（mevalonate），它的合成是由光面内质网中的 HMG-CoA 还原酶催化的。

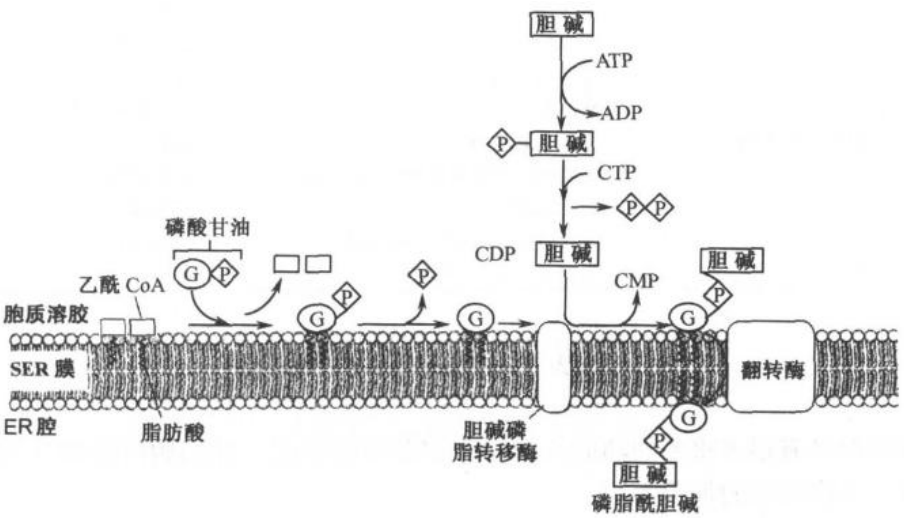


图 9-14　在光面内质网膜中合成磷脂酰胆碱（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）
首先，内质网膜中脂肪酸与胞质溶胶中的磷酸甘油结合，然后脱磷，在内质网膜中胆碱磷脂转移酶的作用下，将胞质溶胶中的 CDP-胆碱与内质网膜中的甘油脂肪酸结合形成磷脂酰胆碱。新合成的磷脂酰胆碱朝向胞质溶胶一侧，但可在内质网膜中翻转酶的作用下翻转到内质网的腔面。

9.2.2.3 脂的合成与转运

光面内质网是脂类合成的主要部位之一。如甘油三酯就是由光面内质网合成并储存在内质网的腔中。动物中储藏脂肪的细胞称为脂肪细胞（fat cell），在脂肪细胞中脂肪滴几乎占据细胞质的主要部分。储存在脂肪滴中的甘油三酯能够被裂解生成甘油和游离脂肪酸。脂肪酸进一步氧化可生成大量的 ATP。所以脂肪细胞是能源的贮备库，为生活在寒冷地区的动物提供热量。

细胞质膜所需要的最重要的磷脂也是在光面内质网上合成的。在光面内质网上合成的磷脂先作为内质网膜的构成部分，然后再转运到其他的膜上。图 9-14 是光面内质网合成磷脂酰胆碱的过程，反应中最先形成的磷脂被包埋在内质网的膜中，但朝向胞质溶胶。合成的终产物磷脂酰胆碱仍然存在于内质网膜中。催化反应的酶类有些存在于胞质溶胶中，也有的就是内质网膜蛋白。

既然磷脂的合成都是在内质网的胞质溶胶面，它是怎样转变成双分子层？其实在内质网上合成的磷脂几分钟之后就由细胞质基质转向膜的另一面，即内质网腔面，其转位速度比自然转 位速度要快 10^5 倍，磷脂的转位是由内质网膜中磷脂转运蛋白（phospholipid translocator）或称翻转酶（flippase）帮助的。翻转酶催化的磷脂移动也是有选择性的，如能够将磷脂酰胆碱翻转的翻转酶则不能催化其他的磷脂翻转，这样保证了膜中磷脂分布的不对称。

内质网中的磷脂不断合成，使得内质网的膜面积越来越大，必须有一种机制将磷脂转运到其他的膜才能维持内质网膜的平衡，这就是磷脂转运。

磷脂的转运有两种方式。一种是通过水溶性的磷脂交换蛋白（phospholipid exchang protein, PEP）的作用。PEP 是一种水溶性的载体蛋白，可以在不同的膜结合细胞器之间转移磷脂。转移的过程是：PEP 首先与磷脂分子结合，形成水溶性的复合物进入胞质溶胶中，通过自由扩散，直至遇上其他的膜时，PEP 将磷脂释放出来，并插在膜上，结果使磷脂从磷脂含量高的膜上转移到磷脂少的膜上，即从磷脂合成的部位——内质网转运到线粒体、过氧化物酶体等膜上（图9-15）。

磷脂的第二种转运方式是以出芽的方式转运到高尔基体、溶酶体和细胞质膜上，详细机制在后面介绍。

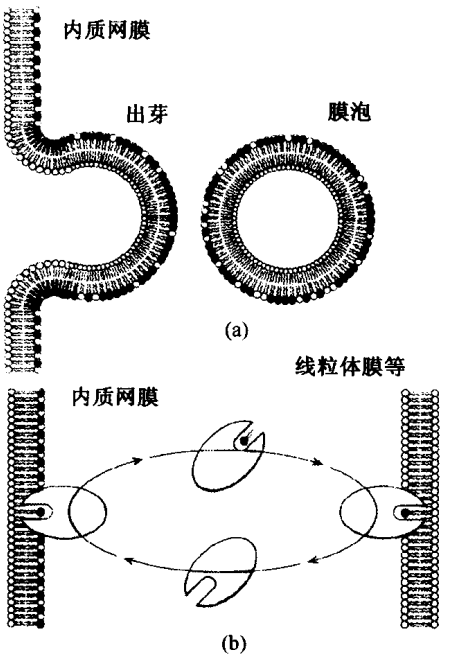


图 9-15 膜磷脂转运的两种方式
（引自 Karp, 1999）
(a) 通过出芽和小泡运输将内质网上合成的脂转运到其他内膜系统的膜上包括细胞核膜；(b) 通过磷脂转运蛋白将内质网上合成的脂转运到线粒体、叶绿体和过氧化物酶体的膜中。

9.2.2.4 解毒作用

光面内质网的一个独特的功能就是能够对外来的有毒物质，如农药、毒素和污染物进行解毒（detoxification）。多数解毒反应与氧化作用有关，有些也涉及还原和水解作用，或者三者结合，使有毒物质由脂溶性转变成水溶性而被排出体外。此反应主要在肝细胞的光面内质网中进行，故此称为肝细胞的解毒作用。

最早发现细胞中含有氧化有毒物质的酶系是 1953 年，Mueller 和 Miller 报道，致癌物 aminoazo 染料在有氧和 NADPH 存在下，能够被肝的匀浆液氧化。此后不久，Brodie 和他的同事发现很多其他的药物和化学物质能够在氧和 NADPH 的存在下被从肝细胞中分离的微粒体所氧化。所有这些物质的氧化作用都涉及一个相同的机制：每氧化 1 分子底物，要消耗 1 分子的氧，进而将 NADPH 转变成 $NADP^+$。由于这种反应的一个氧原子出现在产物中，其他则存在于水分子中，故将催化这种类型氧化作用的酶称为混合功能氧化酶（mixed-function oxidase）。

微粒体的混合功能氧化酶系统类似一条呼吸链，由几个组分组成，核心成员是细胞色素 P450（cytochrome P-450），它是光面内质网上的一类含铁的膜整合蛋白，因在 450nm 波长处具有最高吸收值，因此而得名。细胞色素 P450 是肝细胞光面内质网的主要膜蛋白，约占光面内质网膜蛋白的 20%，占细胞总蛋白的 2%～3%。细胞色素 P450 参与有毒物质以及类固醇和脂肪酸的羟基化。羟基化涉及 4 个基本反应：被氧化的物质同细胞色素 P450 结合→细胞色素 P450 中的铁原子被 NADPH 还原→氧同细胞色素 P450 结合→底物结合 1 个氧原子被氧化，另 1 个氧原子用于形成水（图 9-16）。被氧化的底物由于带上羟基，增强水溶性，容易被分泌排出。除了解毒作用之外，细胞色素 P450 还参与正常代谢途径中的胆固醇和脂肪酸的氧化。

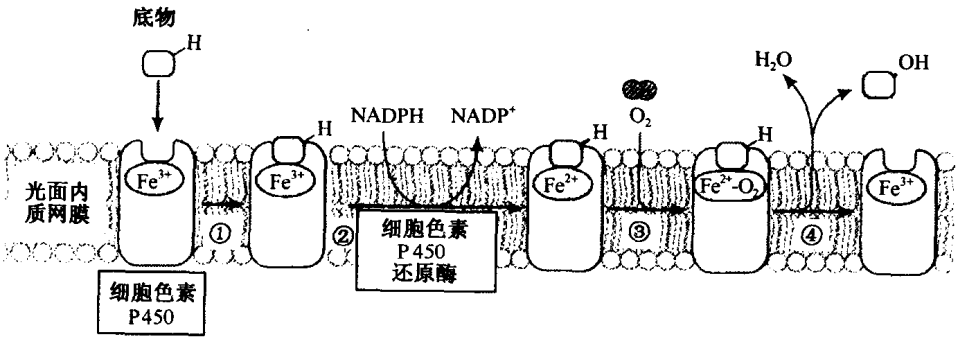


图 9-16 混合功能氧化酶将底物羟基化的机制

9.2.2.5 Ca^{2+} 的调节作用

肌质网是细胞内特化的光面内质网，是储存 Ca^{2+} 的细胞器。肌质网膜上重要的膜蛋白是 Ca^{2+}-ATP 酶，光面内质网可构成心肌和骨骼肌肌原纤维周围的肌质网。当神经递质与肌细胞表面受体结合，触发了信号的级联反应，引起肌质网释放 Ca^{2+}，从而导致肌细胞的收缩活动。当肌肉松弛时，钙离子又重新泵回肌质网。所以肌质网实际上是作为钙库，其内有高浓度钙结合蛋白，每个钙结合蛋白可以结合 30 个左右的 Ca^{2+}。

9.2.3 糙面内质网的功能——蛋白质转运

糙面内质网的基本功能与光面内质网完全不同，这是因为糙面内质网的表面结合有核糖体，所以它的主要功能自然与核糖体的作用相关联。由于细胞内除内膜系统外，其他部分所需蛋白质都是游离核糖体合成提供的，在糙面内质网上合成的蛋白质最终去向是提供给内膜系统、细胞质膜以及细胞外。所以糙面内质网在从与其结合的核糖体上合成的蛋白质中获得自己所需的蛋白质的同时，帮助内膜系统的蛋白质转运也就责无旁贷。

膜结合核糖体上合成的蛋白质与游离核糖体上合成的蛋白质去向是不同的，表 9-5 列出了这两类核糖体合成的某些蛋白质。

表 9-5 真核细胞中膜结合核糖体和游离核糖体合成的某些蛋白质

膜结合核糖体	游离核糖体
分泌蛋白	可溶性胞质溶胶蛋白
肽类激素	脂锚定膜蛋白
生长因子	(位于质膜的胞质面)
消化酶类	外周蛋白
血清蛋白	(质膜的胞质面)
细胞外基质蛋白	核基因编码的线粒体蛋白
释放到 ER 腔中的蛋白质	核基因编码的叶绿体蛋白质
RER 中的酶类	过氧化物酶体蛋白
高尔基体的酶	核蛋白
溶酶体的酶	
整合膜蛋白	
ER 膜的糖蛋白	
高尔基体的膜糖蛋白	
溶酶体膜糖蛋白	
质膜糖蛋白	
核膜糖蛋白	
脂锚定质膜蛋白	
质膜的外周蛋白	
(位于质膜的外侧面)	

由此看来，糙面内质网的主要功能是进行膜结合核糖体合成的蛋白质的运输，并在运输的同时对这些蛋白质进行加工修饰和折叠，以帮助这些蛋白质准确到达目的地。

9.2.3.1 信号序列的发现和证实

在 Palade 用离心技术分离到有核糖体结合的微粒体，即发现膜结合核糖体之后推测：膜结合核糖体合成的蛋白质首先要进入内质网，然后通过选择性分泌输出到细胞外，而游离核糖体上合成的蛋白质则留在细胞内使用。

20 世纪 60 年代，Redman 和 Sabatini 用分离的 RER 小泡研究膜结合核糖体合成的蛋白质

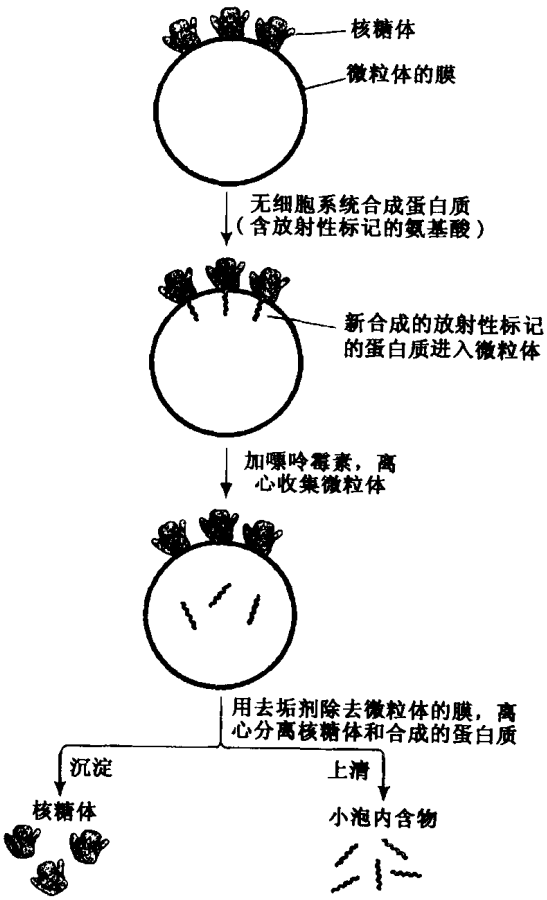


图 9-17　证明膜结合核糖体合成的蛋白质进入 RER 腔的实验（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

是否会进入 RER 的腔。他们将 RER 微粒体置于加有放射性标记氨基酸底物的蛋白质合成体系中进行短暂温育，然后加入嘌呤霉素，使蛋白质合成提前终止并从核糖体中释放出不完全的多肽。此时离心收集 RER 小泡，用去垢剂将 RER 小泡破坏，使小泡内的物质释放出来，并对其进行分析，结果表明，从破裂的 RER 小泡中释放出来的物质中有放射性标记的新合成的多肽（图 9-17）。

这一实验结果说明膜结合核糖体合成的蛋白质能够跨过内质网的膜进入内质网腔。但是什么原因指导新生肽跨过内质网的膜呢？另外还有一个问题：我们所观察到的结合在糙面内质网上的核糖体是正在进行蛋白质合成的核糖体，也就是说，膜结合核糖体是处于工作状态的核糖体。静息状态的核糖体或是刚刚起始合成蛋白质的核糖体都是游离状态；那么，是什么原因决定核糖体在合成蛋白质时是游离存在还是附着到内质网上？

针对上面的问题，1971 年美国洛克菲勒大学的 Blobel、Sabatini 和 Dobberstein 等推测：蛋白质合成的地点是由多肽 N 端一段氨基酸序列决定的，这一段氨基酸序列在蛋白质合成时最先出现在核糖体上。根据推测他们提出了如下建议：①分泌蛋白的 N 端含有一段特别的信号序列（signal sequence）可将多肽和核糖体引导到 ER 膜上；②多肽通过 ER 膜上的转运通道蛋白进入 ER 的腔中，并推测多肽是在合成的同时转移的。

1972 年，Milstein 和他的同事用无细胞系统研究免疫球蛋白 IgG 轻链合成时获得了信号序列存在的直接证据。他们用分离纯化的核糖体在无细胞体系中用编码免疫球蛋白轻链的 mRNA 指导合成多肽，发现合成的多肽比分泌到细胞外的成熟的免疫球蛋白在 N 端有一段多出的肽链，它有 20 个氨基酸，他们推测，这段肽具有信号作用，使 IgG 得以通过糙面内质网并继而分泌到细胞外。

Blobel、Dobberstein、Walter 和他们的同事在上述发现的基础上用分离的微粒体和无细胞体系进行了大量的实验，进一步证实了信号序列的存在及其作用。

加与不加 RER 小泡，产物不同　当将分泌蛋白的 mRNA 在无细胞体系中进行翻译时，如果不加糙面内质网（微粒体），获得的翻译产物比从细胞中分泌出来的蛋白质要长，但是在无细胞系统中添加 RER 小泡后，翻译的产物长度与从活细胞分泌的蛋白质相同。因此推测信

号序列在引导蛋白质进入内质网后被切除了，所以成熟的蛋白质的 N 端没有信号序列（图 9-18）。通常将有信号序列的蛋白质称为前蛋白质（pre-protein），或前肽（pre-peptide）。

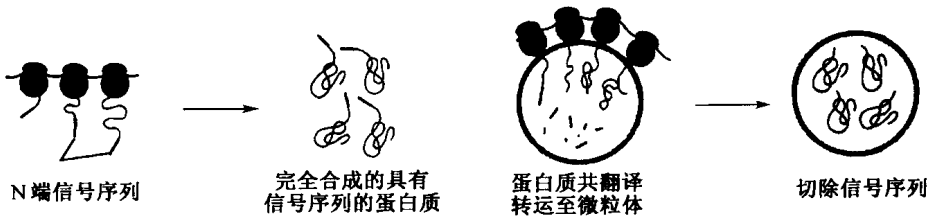


图 9-18　信号序列在分泌蛋白质运输中的作用（引自 Lodish *et al*., 1995）
(a) 在不含 RER 小泡的无细胞体系中翻译分泌蛋白，其 N 端有信号序列，故比从细胞中分泌出来的相同蛋白质肽链长；(b) 在加有 RER 小泡的无细胞体系中翻译分泌蛋白，信号序列在 RER 小泡中被切除，得到的产物与从细胞中合成分泌的相同。

蛋白水解酶水解实验　在分泌蛋白进行体外翻译的无细胞系统中（含有 RER 小泡）加入蛋白水解酶，并不能使新生肽水解。但同时加入去垢剂，则能将蛋白质水解，提示新生肽链是边合成边运输的，因为去垢剂能够破坏内质网的膜，使合成的蛋白质暴露被蛋白水解酶降解。若无去垢剂，多肽在合成的同时就向内质网转运，所以不受蛋白水解酶的影响。

多聚核糖体的离体翻译　多聚核糖体是研究内质网帮助蛋白质运输的好材料。不难想像，当一条 mRNA 上结合有若干个核糖体进行蛋白质翻译时，最先结合上的核糖体，其合成的多肽最长，最尾端的核糖体只是刚刚开始进行翻译。如果翻译的是分泌蛋白，最先结合上的核糖体合成的多肽，其 N 端可能没有了信号序列，因为在内质网中被切除了。从骨髓瘤分离多聚核糖体，用去垢剂处理，使之与内质网膜分离后，继续在无细胞体系（不含 RER 小泡）中进行翻译。发现：短时间温育，即可得到成熟的分泌蛋白（无信号序列）；而长时间的温育，得到的产物 N 端有信号序列。这一结果说明由于 mRNA 中多聚核糖体合成蛋白质的不同步，位于 mRNA 3′端的核糖体合成的蛋白质在分离前不仅进入了内质网，而且在内质网的腔中被切除了信号序列。越靠近 mRNA5′端的核糖体合成的蛋白质越短，所以在体外经较长时间的翻译得到的是含有信号序列的前蛋白质，因为没有了内质网，信号序列则不能被切除。

9.2.3.2　信号序列的一般特征及早期信号假说

Blobel、Dobberstein、Walter 和他们的同事在研究中还发现信号序列具有一些共同的特性：长度一般为 15～35 个氨基酸残基，N 端含有 1 个或多个带正电荷的氨基酸，其后是 6～12 个连续的疏水残基；在蛋白质合成中将核糖体引导到内质网，进入内质网后通常被切除（图 9-19）。

1975 年，Blobel 和 Dobberstein 根据对信号作用的研究成果，正式提出了信号假说（signal hypothesis），要点是：①分泌蛋白的合成始于细胞质中的游离核糖体；②合成的 N 端信号序列露出核糖体后，靠自由碰撞与内质网膜接触，然后靠 N 端信号序列的疏水性插入内质网的膜；③蛋白质继续合成，并以袢环形式穿过内质网的膜；④如果合成的是分泌蛋白，除了信号序列被信号肽酶切除外，全部进入内质网的腔；若是膜蛋白，则由一个或多个停止转移

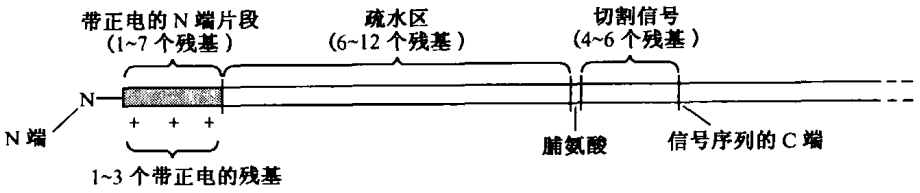


图 9-19　ER 跨膜可切除信号序列的一般结构

信号将蛋白质锚定在内质网膜上。

信号假说提出后得到许多实验的支持，包括 Blobel 的研究小组和其他研究小组获得的证据。其中最有力的一项实验结果是 Lingappa 及其同事用杂合蛋白研究的结果。黑猩猩的 α-珠蛋白是一种在游离核糖体上合成并存在于胞质溶胶中的可溶性蛋白质，他们在编码该蛋白质的基因中接上一段编码 *E. coli* 分泌蛋白 β-内酰胺酶（β-lactamase）的信号序列 DNA，β-内酰胺酶是一种分泌蛋白。然后将该基因加入到无细胞的转录和翻译体系中，并加入从狗组织中分离的 ER 膜。分析发现，杂合蛋白质出现在 ER 腔中，并且信号序列被切除了。这一研究结果不仅证实了信号假说的正确性，也揭示了信号序列的一个重要特性：信号序列没有特异性，并且原核生物的信号序列在真核生物中也是有效的。

Blobel 提出信号假说，揭示了细胞中不同蛋白质在合成后是如何找到自己的工作岗位的秘密，发现了蛋白质与生俱来的“地址签”。这一发现开辟了一个全新的医学、细胞生物学和分子生物学的研究领域，为此获得了 1999 年诺贝尔医学/生理学奖。

9.2.3.3　新蛋白复合物的发现与信号假说的补充

1981 年，Walter、Blobel 和其合作者们通过实验发现在核糖体与内质网的结合过程中需要几种蛋白质复合物的参与，这些发现对信号假说作了一些补充，增加了信号序列如何同核糖体结合的一些细节。发现的第一个复合物是信号识别颗粒（signal recognition partical，SRP），是一种核糖核蛋白复合体，沉降系数为 11S，含有分子质量为 72、68、54、19、14 及 9kDa 的 6 条多肽和一个 7S（长约 300 个核苷酸）的 scRNA（图 9-20）。

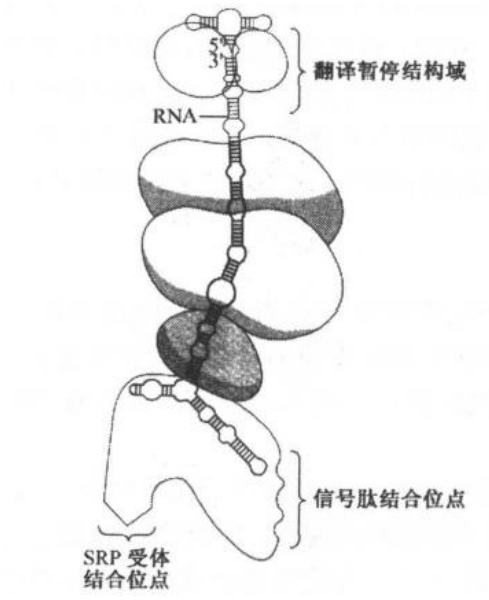


图 9-20　信号识别颗粒（SRP）的组成
（引自 Becker *et al.*，1996）

SRP 上有 3 个功能部位：翻译暂停结构域（P9/P14）、信号肽识别结合位点（P54）、SRP 受体蛋白结合位点（P68/P72）。因此，SRP 能够识别刚从游离核糖体上合成出来的信号肽，并与之结合，暂时中止新生肽的合成；同时与内质网上的停靠蛋白结合，使核糖体附着到内质网膜上，并进行新生肽的转移。SRP 对正在合成的其他无信号序列的蛋白质无作用，这些游离核糖体也就不能附着到内质网膜上。

停靠蛋白（docking protein，DP）是后来发现的

与 SRP 和 ER 结合相关的第二种蛋白质，它是 SRP 在内质网膜上的受体蛋白，它能够与结合有信号序列的 SRP 牢牢地结合，使正在合成蛋白质的核糖体停靠到内质网上。停靠蛋白含有两个亚基，一个亚基是暴露于细胞质的亲水部分，由 640 个氨基酸组成；另一个亚基是嵌入膜内的疏水部分，由 300 个氨基酸组成。

9.2.3.4 蛋白质共翻译转运的机制：信号假说

补充修改后的信号假说比早期的信号假说更为合理，这一假说的核心内容是：核糖体同内质网的结合受制于 mRNA 中特定的密码序列（可以翻译成信号肽），具有这种密码序列的新生肽才能连同核糖体一起附着到内质网膜的特定部位。因此，核糖体同内质网的结合是功能性结合，具有功能性和暂时性，并受时间和空间的限制。正是由于这种结合保证了新合成蛋白质的向量释放。信号序列有两个基本作用：一是通过与 SRP 的识别和结合，引导核糖体与内质网结合；二是通过信号序列的疏水性，引导新生肽跨膜转运。

图 9-21 是修改后的信号假说的主要内容。①ER 转运蛋白质合成的起始。通过 ER 转运的蛋白质合成仍然起始于胞质溶胶中的游离核糖体。核糖体是蛋白质合成的基本装置，它并不决定合成蛋白质的去向，合成的蛋白质何去何从，是由 mRNA 决定的，也就是说是由密码决定的。②信号序列与 SRP 结合。SRP 的信号识别位点识别新生肽的信号序列并与之结合；同时，SRP 上的翻译暂停结构域同核糖体的 A 位点作用，暂时停止核糖体的蛋白质合成。③核糖体附着到内质网上。结合有信号序列的 SRP 通过它的第三个结合位点与内质网膜中受体（停靠蛋白）结合，将核糖体附着到内质网的蛋白质转运通道（protein translocating channel）。④ SRP 释放与蛋白质转运通道的打开。当 SRP-信号序列-核糖体-mRNA 复合物锚定到内质网膜后，SRP 受体将其结合的 GTP 水解同时将 SRP 释放出来，此时蛋白质转运通道打开，核糖体与通道结合，新生的肽插进通道。释放的 SRP 又回到胞质溶胶中循环使用。内质网膜蛋白质转运通道是一个多蛋白质的复合物，详细的作用尚不清楚。

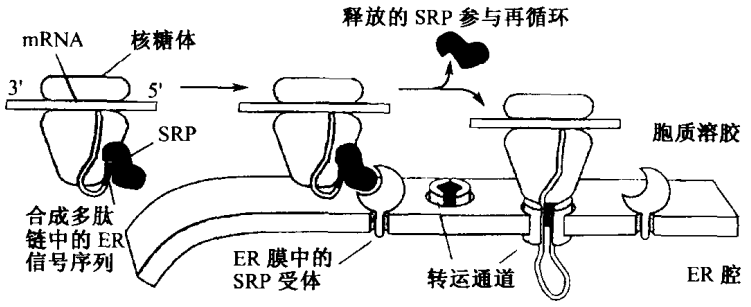


图 9-21 信号序列与 SRP 引导核糖体附着到 ER 膜（引自 Alberts *et al.*, 1994）

以上①～④的过程是核糖体与内质网附着过程，是蛋白质共翻译转运中最重要的步骤。

⑤ 随着 SRP 的释放，蛋白质的合成重新开始，并向内质网腔转运，在此过程不需要能量驱动。⑥信号肽酶切除信号序列。当转运完成之后，若转运多肽的信号序列是可切割的序列则被内质网膜中信号肽酶（signal peptidase）所切割，释放出可溶性的成熟蛋白质，切下的信号序列将被降解。⑦ 蛋白质合成结束。此时蛋白转运通道关闭，核糖体与内质网脱离，进入

胞质溶胶开始新的蛋白质合成。

以上⑤～⑦3步反应是分泌蛋白向ER腔转运过程（图9-22）。

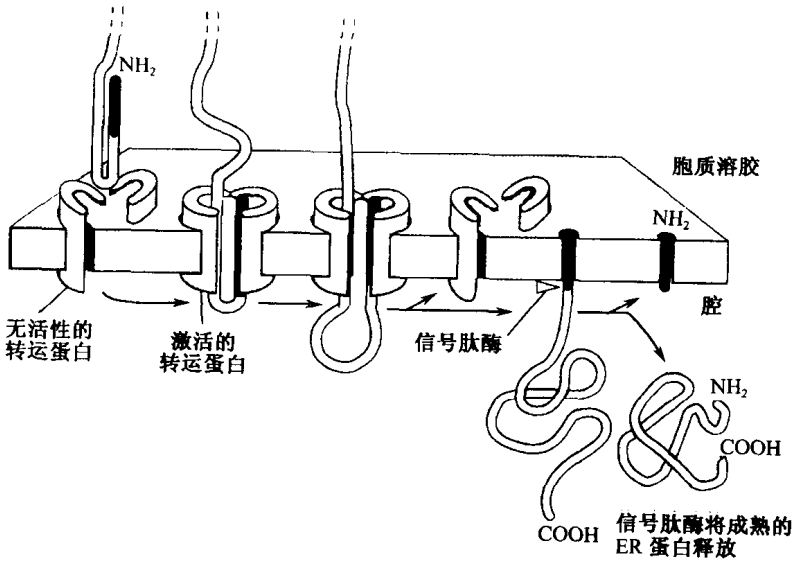


图9-22　可溶性蛋白质的共翻译转运（引自 Alberts *et al*., 1994）

蛋白质转运通道结合信号序列，合成的多肽以袢环的形式从蛋白质转运通道穿过膜的脂双层。在转运的某一适当时机，蛋白质转运通道向两侧打开，信号序列释放，使其进入脂双层，然后被信号肽酶切割。转运的多肽以可溶的形式释放到内质网的腔中。为简便起见，图中略去了核糖体。

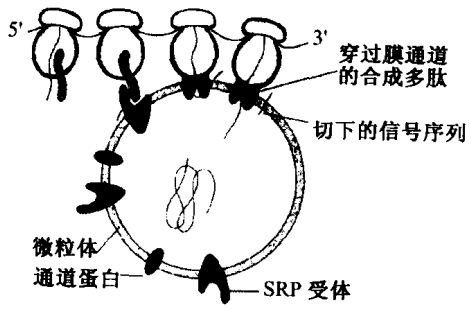


图9-23　SRP、SRP受体和微粒体在分泌蛋白共翻译转运中的作用（引自 Lodish *et al*., 1995）

图中只说明在SRP、SRP受体和微粒体同时存在时，合成了成熟蛋白并存在于微粒体中。

SRP、SRP受体都已分离，并经体外实验证明了它们的作用：在无细胞翻译体系中如果不加SRP、SRP受体、微粒体，分泌蛋白的mRNA合成一条带有信号序列的完整多肽；如果加入SRP、但不加入SRP受体和微粒体，新生肽的合成在完成70～100个氨基酸时被阻断，因为SRP已经与信号序列结合并终止了蛋白质的翻译，但由于找不到受体，SRP不能被释放，所以蛋白质不能继续合成；如果反应体系中加有SRP和SRP受体，但没有微粒体，也能够合成完整的具有信号序列的多肽，并且会伴随GTP的水解而释放出SRP颗粒；如果在反应体系中同时加有SRP、SRP受体和微粒体，将会合成一条成熟的没有信号序列的多肽，并且释放到微粒体中（图9-23）。

现已了解，SRP受体是一种G蛋白，它对分泌蛋白的转运具有重要的调节作用。受体蛋白与GTP结合，表示是活性状态，能够与SRP结合，如果结合的是GDP是非活性状态，不能与SRP结合。

9.2.3.5 膜蛋白的共翻译转运机理

在糙面内质网上合成的蛋白质有两类：分泌蛋白和膜蛋白，分泌蛋白在内质网上合成之后通过对信号切除，即可释放到内质网的腔中成为可溶性蛋白质，即可进行下游途径的运输。膜蛋白的共翻译转运较为复杂，首先它要靠疏水区滞留在内质网膜上；另外膜蛋白分单次跨膜和多次跨膜，还有膜蛋白在膜上的定向问题，即羧基端和氨基端位于内质网膜的内侧（内质网腔面）或外侧（胞质溶胶一侧），还是位于同一侧，这些在跨膜转运之始就要有定论。膜蛋白转运机理同样用信号假说进行解释。

起始转移信号（start-transfer signal）　蛋白质氨基末端的信号序列除了作为信号被SRP识别外，还具有起始穿膜转移的作用。在蛋白质共翻译转运过程中，信号序列的N端始终朝向内质网的外侧，插入蛋白质转运通道后与通道内的信号序列结合位点（受体）结合，

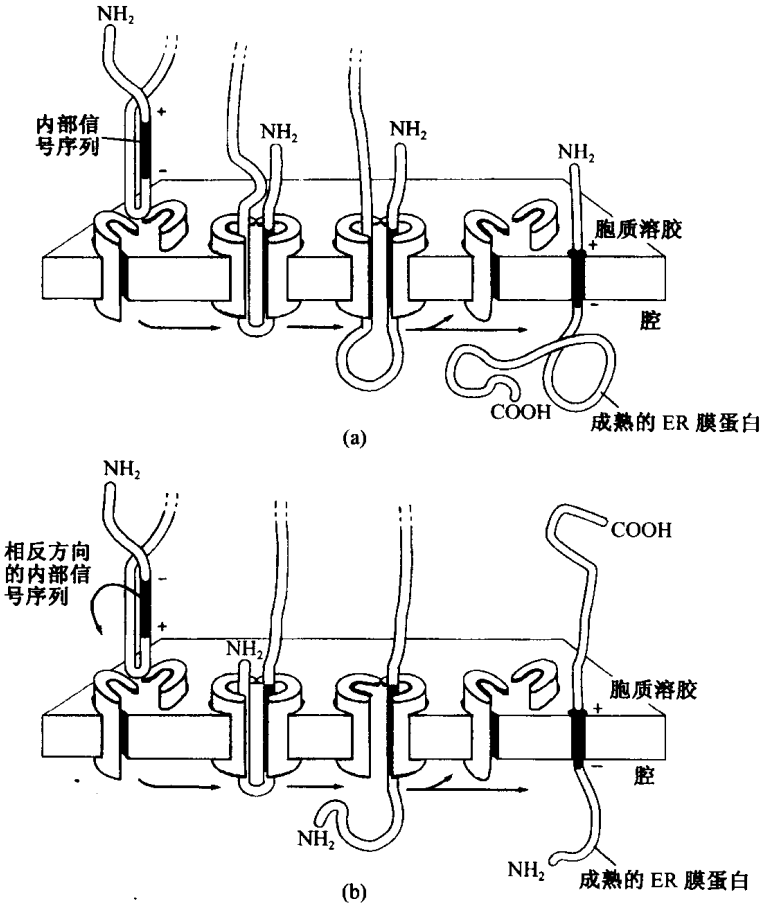


图 9-24　内部信号序列与单次跨膜蛋白（引自 Alberts *et al*., 1994）

内部信号序列首先作为信号序列与SRP一起将核糖体附着到内质网，然后作为起始转移信号与蛋白质转运通道结合引导新生肽的转移。在与转运通道结合过程中，始终保持具有较多正电荷氨基酸的一端朝向胞质溶胶一侧，由于它不能被切除，所以合成的是膜蛋白。(a) 内部信号序列作为起始转移信号，在保持信号序列中具有较多正电荷氨基酸一端朝向胞质溶胶面的情况下与羧基端的臂形成环，插入到转运通道中；(b) 作用方式与 (a) 相同，只是内部信号序列中含较多正电荷一端与氨基端相反，所以要进行调整，在跨膜时保持正电荷一端朝向胞质溶胶面。

其后的肽序列是以袢环的形式通过运输通道。不过 N 端的起始转移序列是可切除的序列，它的旁边有信号肽酶的作用位点，以 N 端信号序列作为起始转移信号的一般都是分泌蛋白。

内部信号序列（internal signal sequence）与单次跨膜蛋白　内含信号序列又称内部信号肽（internal signal peptide），它不位于 N 端，但具有信号序列的作用，故称为内部信号序列。它可作为蛋白质共翻译转移的信号被 SRP 识别，同时它也是起始转移信号，可插入蛋白质转运通道，并与通道中的受体结合，引导其后的多肽序列转运。内部信号序列是不可切除的信号序列，这是与 N 端信号序列的一个重要区别。由于内部信号序列是不可切除的，又是疏水性的，所以它是膜蛋白的一部分，如果共翻译转运蛋白质中只有一个内部信号序列，那么合成的蛋白质就是单次跨膜蛋白质（图 9-24）。

终止转移肽（stop-transfer peptide）与单次跨膜蛋白　单次跨膜蛋白的形成除了与含有内部信号序列有关外，终止转移肽也与单次跨膜蛋白的形成相关。终止转移肽又称终止转运信号（stop-transfer signal），它是存在于新生肽中使肽链终止转移的一段信号序列，可导致蛋白质锚定在膜的双脂层中。因终止转移信号的作用而形成单次跨膜的蛋白质，那么该蛋白质在结构上只有一个终止转移信号序列，没有内部转移信号，但在 N 端有一个信号序列作为起始转移信号（图 9-25）。

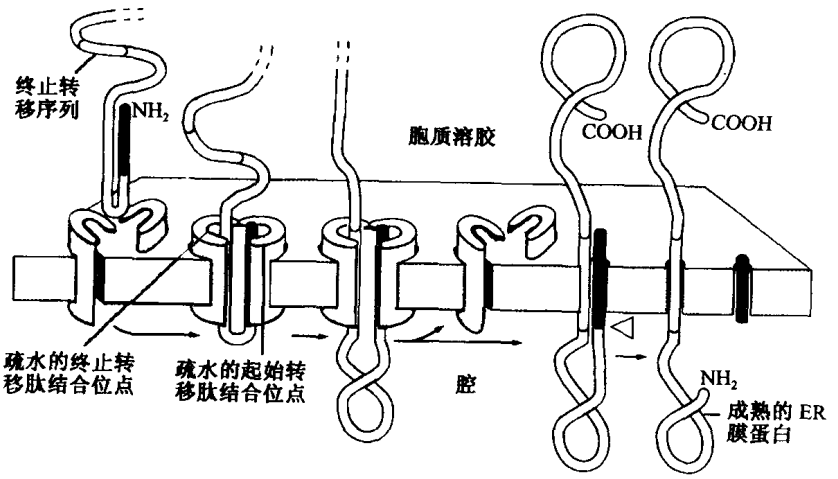


图 9-25　终止转移信号与单次跨膜蛋白的形成（引自 Alberts *et al*., 1994）
该蛋白在 N 端信号序列的作用下进行共翻译转运，当停止转移信号进入通道后，与通道内的结合位点相互作用，使通道转运蛋白失活，从而停止蛋白质的转运。由于 N 端的信号序列是可切除的，信号序列被切除后形成单次跨膜蛋白。

二次跨膜蛋白与多次跨膜蛋白　所谓二次跨膜就是在蛋白质中有两个跨膜的疏水区，多次跨膜则有多个起始跨膜信号与多个终止转移信号，它们的形成与内部信号序列和终止转移信号相关。如果是二次跨膜，则含有一个内部信号序列和一个终止转移信号（图 9-26）。

在了解了二次跨膜形成的方式之后，不难推测多次跨膜蛋白的形成一定含有多个内部信号序列和多个终止转移信号。

因此，新生肽上是否含有终止转移信号决定了新生肽是否全部穿过内质网膜成为内质网腔中的可溶性蛋白质还是成为膜蛋白。N 端的信号序列和内部信号序列都可作为起始转移信

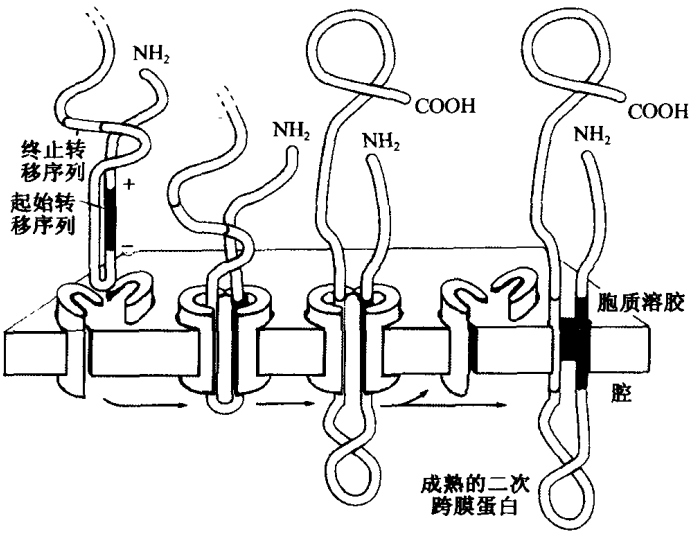


图 9-26　二次跨膜蛋白的形成（引自 Alberts *et al*.，1994）
内部信号序列形成一个跨膜区，终止转移序列形成一个跨膜区，二者相加就成为二次跨膜蛋白。

号，但 N 端的信号序列是可切除的，而内部信号序列是不可切除的。膜蛋白的跨膜次数是由其内部信号序列和终止转移信号序列的数目决定的，这些信号序列都是多肽链中的疏水氨基酸区，因此，根据多肽链中疏水氨基酸区的数目和位置可以预测其穿膜情况。另外，由于膜蛋白总是从胞质溶胶穿入内质网膜，并且总是保持信号序列中含正电荷多的氨基酸一端朝向胞质溶胶面，因而相同蛋白质在内质网中的取向也必然相同。结果造成内质网膜中蛋白质取向的不对称性，并由此决定了该蛋白质在其他膜结合细胞器的膜结构中的方向。

9.2.3.6　Bip 蛋白在 ER 蛋白质的转移和装配中的作用

研究发现进入内质网腔中的蛋白质片段很快被一种称为 Bip 的蛋白结合。Bip 蛋白是重链结合蛋白（heavy-chain binding protein）的简称，因为它能够同 IgG 抗体的重链结合。Bip 是一类分子伴侣，属于 Hsp70 家族，在内质网中有两个作用。

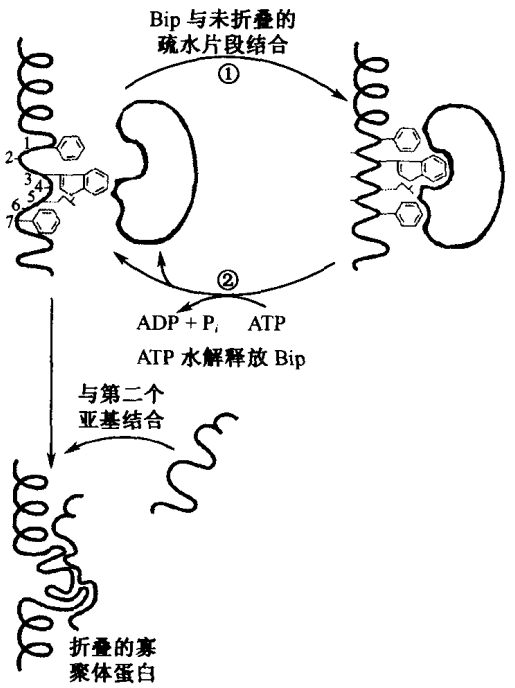


图 9-27　Bip 在 ER 腔中的作用
（引自 Lodish *et al*.，1995）
Bip 与转运到 ER 中蛋白的疏水部分结合，防止蛋白质的变性或降解，使其正确地折叠。结合有蛋白质的 Bip 在 ATP 水解后释放被结合的蛋白，如果释放的蛋白仍然是未折叠的，Bip 将重新与这种蛋白质结合。Bip 还可帮助两种不同的蛋白质共同装配。

第一，Bip 同进入内质网的未折叠蛋白质的疏水氨基酸结合，防止多肽链不正确地折叠和聚合。然后 Bip 同 ATP 结合并通过 ATP 的水解释放出结合的多肽。在多数情况下，释放出的多肽很快折叠，或者同别的亚基共同组装成完整的蛋白质。正确折叠和装配的蛋白质不会同 Bip 再结合，但是，如果蛋白质进行了不正确的折叠或错误的装配，Bip 会马上同这种蛋白质结合，使蛋白质处于未折叠的状态，从而防止了错误的折叠（图 9-27）。

Bip 的第二个作用是防止新合成的蛋白质在转运过程中变性或断裂。通过重组 DNA 技术，将酵母中编码 Bip 蛋白的基因突变成温度敏感型后，当提高细胞培养温度时，Bip 的功能就会丧失，蛋白质向 ER 的转移也会停止，推测由于 Bip 的功能丧失，导致蛋白质在 ER 中的聚集，抑制了新生肽向 ER 的转移。

9.2.3.7 蛋白质在内质网中的修饰

新生肽进入 ER 腔之后除了要进行正确的折叠之外，还要经过各种不同的修饰之后才能运送到其他的部位。

N-糖基化

ER 上合成的蛋白质大多数是糖蛋白（glycoprotein），是由糖和蛋白质共价连接形成的。糖是在蛋白质合成完成之前加上去的，是直接加到正在生长中的多肽链上（图 9-28）。由于糖是同天冬酰胺的自由 NH_2 连接，所以将这种糖基化称为 *N*-糖基化（*N*-linked glycosylation）。糖基化的第一步是将一个十四碳糖的核心寡聚糖添加到新形成多肽链的天冬酰胺上，其氨基酸的特征序列是 Asn-X-Ser/Thr（X 代表任何一种氨基酸），天冬酰胺作为受体。

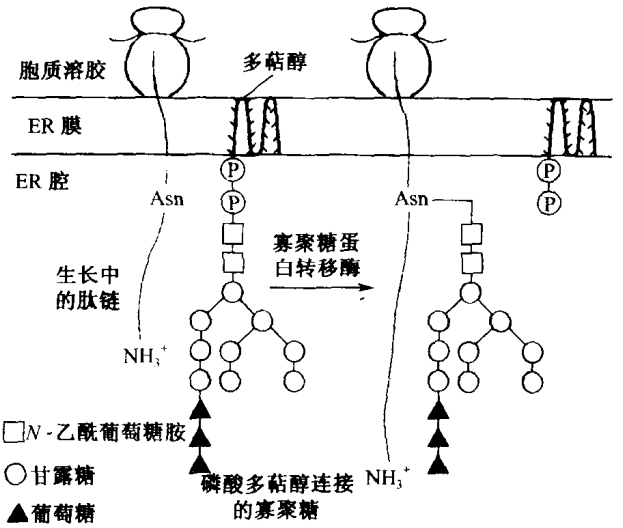


图 9-28 正在 ER 中合成的多肽的 *N*-糖基化（引自 Lodish *et al*., 1995）

核心寡聚糖是由 *N*-乙酰葡萄糖胺、甘露糖和葡萄糖组成。这种寡聚糖同 ER 膜中的多萜醇磷酸（dolichol phosphate）紧紧相连。被转移到新生肽上的寡聚糖在 ER 中会进一步加工，主要是切除 3 分子葡萄糖和 1 分子甘露糖。磷酸多萜醇是长链的醇，故又称磷酸长醇。它具有很长的疏水尾部能够紧紧的结合在膜的双脂层上。核心寡聚糖链是结合在磷酸多萜醇的磷

酸基上，当 ER 膜上有蛋白质合成时，整个糖链一起转移。

羟基化

除了 *N* -糖基化以外，新生肽的脯氨酸和赖氨酸要进行羟基化（hydroxylation），形成羟脯氨酸和羟赖氨酸，不过这种反应只是在少数蛋白质上发生。在合成胶原的细胞中，脯氨酸和赖氨酸羟基化则是一个主要的反应。

形成脂锚定蛋白

新合成的蛋白质除了成为跨膜蛋白或 ER 腔中的游离蛋白质外，还会通过酰基化同 ER 膜上的糖脂结合，将自己锚定在 ER 膜上。图 9-29 是新合成的 ER 蛋白被信号肽酶从 ER 上切割之后，立即通过羧基端与已存在于 ER 膜上的糖基磷脂酰肌醇（glycosylphosphatidylinositol，GPI）共价结合，形成脂锚定蛋白的简化过程。形成的脂锚定糖蛋白通过进一步的运输成为质膜外侧的膜蛋白。

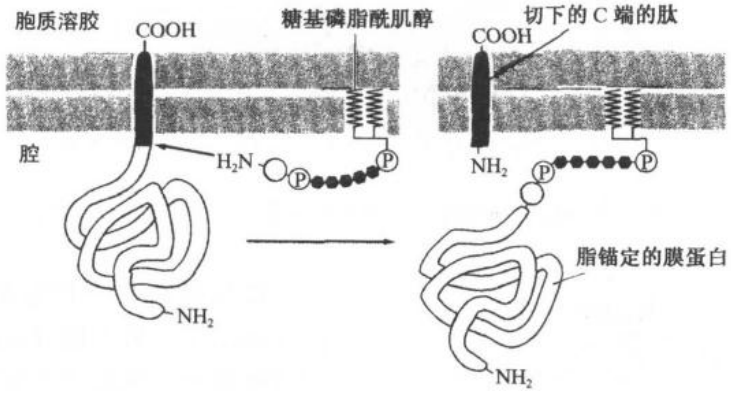


图 9-29　蛋白质附着到糖基磷脂酰肌醇成为脂锚定蛋白（引自 Alberts *et al*.，1998）

上面我们详细讨论了蛋白质通过共翻译转运到 ER 中的过程和机制，其实，某些蛋白质也可通过翻译后跨 ER 膜运输，由于这些蛋白质的信号序列太短而无法与 SRP 相互作用，它们主要是靠分子伴侣维持非折叠状态进行跨膜转运。关于翻译后跨 ER 膜运输的详细机制还不太清楚。

9.3　高尔基体

高尔基体（Golgi body，Golgi apparatus）是内膜系统中另一个重要的膜结合细胞器，大多数共翻译转运的蛋白质进入 ER 后都要通过膜运输机制转运到其他的部位，其中第一个停靠站就是高尔基体。

高尔基体又称高尔基复合体（Golgi complex）或高尔基体，是意大利科学家 Golgi 在 1898 年发现的，它是普遍存在于真核细胞中的一种细胞器。

高尔基体与细胞的分泌功能有关，能够收集和排出内质网所合成的物质，它也是聚集某些酶原颗粒的场所，参与糖蛋白和黏多糖的合成。高尔基体与溶酶体的形成有关，并参与细胞的胞饮和胞吐过程。

9.3.1 高尔基体的形态结构和极性

9.3.1.1 形态结构

电子显微镜所观察到的高尔基体最富有特征性的结构是由一些（通常是4～8个）排列较为整齐的扁平膜囊（saccule）堆叠在一起，构成了高尔基体的主体结构。扁平膜囊多呈弓形，也有的呈半球形或球形，均由光滑的膜围绕而成，膜表面无核糖体颗粒附着（图9-30）。

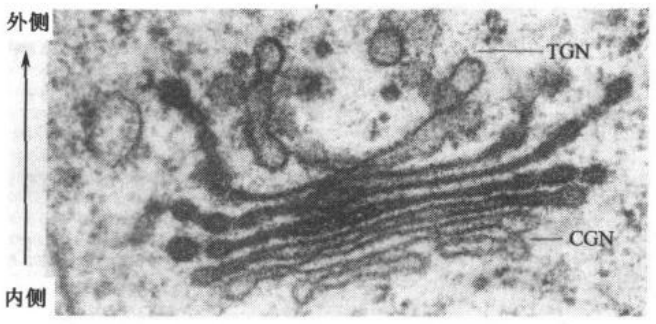


图9-30 烟草根尖细胞高尔基体的电镜照片（引自 Karp，1996）

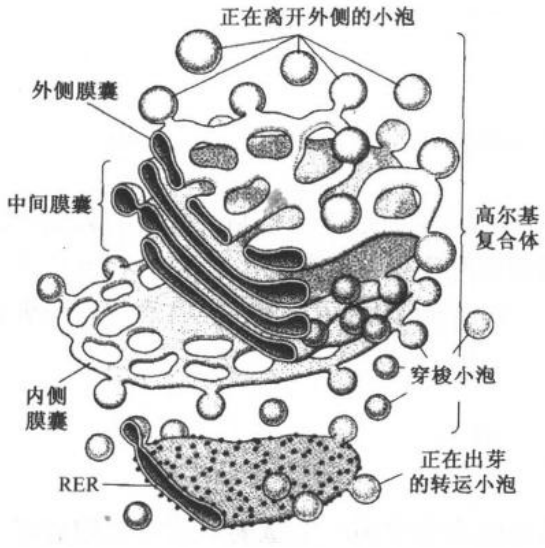


图9-31 高尔基体的膜囊结构及其排列
（引自 Wolfe，1993）
高尔基体的内侧是囊泡结构，靠近糙面内质网，中间部分是扁平膜囊，外侧也是囊泡结构。

高尔基体由平行排列的扁平膜囊、液泡（vacuole）和小泡（vesicle）等3种膜状结构所组成。它有两个面：形成面（内侧）和成熟面（外侧），来自内质网的蛋白质和脂从形成面逐渐向成熟面转运（图9-31）。

扁平膜囊 是高尔基体的主体部分。一般由3～10层扁平膜囊平行排列在一起组成一个扁平膜囊堆（stack of saccule），每层膜囊之间的距离为15～30nm，每个扁平囊是由两个平行的单位膜构成，膜厚6～7nm。

液泡 多见于扁平膜囊扩大之末端，可与之相连。直径0.1～0.5μm，泡膜厚约8nm。大泡内部为电子密度不同的物质，这是与这些物质的成熟阶段有关。液泡又称为分泌泡或浓缩泡（condensing vesicle）。当分泌颗粒排出时，液泡的膜与细胞膜融合，将分泌物排出，因此，扁平膜囊的膜又不断被减少。

小泡 在扁平膜囊的周围有许多小泡，直径40～80nm。这些小泡较多地集中在高尔基

体的形成面。一般认为它是由附近的糙面内质网出芽形成的运输泡。它们不断地与高尔基体的扁平膜囊融合，使扁平膜囊的膜成分不断得到补充。

9.3.1.2 高尔基体的极性

高尔基体虽然是由膜囊构成的复合体，但是不同的膜囊有不同的功能，执行功能时又是“流水式”操作，上一道工序完成了，才能进行下一道工序，这就是高尔基体的极性。

高尔基体可分为几个不同的功能区室。①靠近内质网的一面是由一些管状囊泡形成的网络结构，通常将这一面称为内侧面（*cis* face），或称形成面（forming face）。由于内侧面是网络结构，所以又称高尔基体内侧网络（*cis* Golgi network，CGN）。从功能上看，CGN 被认为是初级分选站（primarily sorting station），负责对从 ER 转运来的蛋白质进行鉴别，决定哪些需要退回，哪些可以进入下一站。②中间潴泡（medial cisternae）由扁平膜囊和管道组成，形成不同的区室，但功能上是连续的、完整的膜体系。多数糖基修饰、糖脂的形成以及与高尔基体有关的多糖的合成都发生在中间膜囊中。③高尔基体外侧网络（*trans* Golgi network，TGN），是高尔基体最外侧的管状和小泡状结构组成的网络，通常称为外侧面（transface），或称成熟面。它是高尔基体的组成部分，并且是最后的区室。蛋白质的分选信号在此被特异的受体接受，进行分拣，集中，形成不同的分泌小泡，被运送到不同的地点。因此，它的主要功能是参与蛋白质的分类与包装，并输出高尔基体。

9.3.1.3 数量和分布

生物体中高尔基体的数量不等，平均为每细胞 20 个。在低等真核细胞中，高尔基体有时只有 1～2 个，有的可达一万多个。在分泌功能旺盛的细胞中，高尔基体都很多。如胰腺外分泌细胞、唾液腺细胞和上皮细胞等。而肌细胞和淋巴细胞中高尔基体较少见。

高尔基体只存在于真核细胞中，原核细胞中则无。在一定类型的细胞中，高尔基体的位置比较恒定，如外分泌细胞中高尔基体常位于细胞核上方，其外侧面朝向细胞质膜。神经细胞的高尔基体有很多膜囊堆分散于细胞核的周围。

9.3.1.4 高尔基体的化学组成

高尔基体的化学成分分析结果多是从大白鼠或豚鼠胰腺细胞方面得到的。因为用这种细胞的高尔基体经过离心所得的碎片或亚碎片比较纯，并且与其他组织器官方面的分析所得结果相近。

从蛋白质含量看，高尔基体高于内质网和质膜：质膜的蛋白质含量为 40%，内质网的蛋白质含量为 20%，而高尔基体的蛋白质含量占 60%。

从所含的总磷脂看，高尔基体介于内质网和质膜之间（表 9-6）。

高尔基体的膜上含有丰富的酶类，如糖基转移酶、磺化糖基转移酶、氧化还原酶、磷酸酶、激酶、甘露糖苷酶、磷脂酶等。但在膜上的分布并不均一（表 9-7）。高尔基体的标志酶是糖基转移酶。

表 9-6　内质网、高尔基体和质膜的磷脂组成

膜类型	总磷脂	磷脂类型				
		神经鞘磷脂	磷脂酰胆碱	磷脂酰乙醇胺	磷脂酰丝氨酸磷脂肌醇	胆固醇
糙面内质网	61%	3.4	47.8	36.8	5.6	0.12
高尔基体	45%	14.2	31.4	36.5	4.7	0.47
细胞质膜	40%	19.2	32.0	34.4	4.6	0.51

表 9-7　高尔基体不同区室酶的分布比较

酶	内侧潴泡	中间潴泡	外侧潴泡
脂肪酰基转移酶	+		
甘露糖苷酶 I	+		
乙酰葡萄糖胺转移酶 I		+	
甘露糖苷酶 II		+	
NADPase		+	
磷酸酶		+	
腺苷酸环化酶	+	+	+
5′-核苷酶	+	+	+
酸性磷酸酶			+
核苷二磷酸酶			+
唾液酸转移酶			+
硫胺素焦磷酸酶			+
半乳糖基转移酶			+

9.3.2　高尔基体的功能

高尔基体的主要功能是参与细胞的分泌活动，将内质网合成的多种蛋白质进行加工、分类与包装，然后分门别类地运送到细胞的特定部位或分泌到细胞外。内质网上合成的脂类一部分也要通过高尔基体向细胞质膜等部位运输。

9.3.2.1　蛋白质和脂的运输

定位于内质网、高尔基体、溶酶体、胞内体、细胞质膜及分泌到细胞外的蛋白质都是在糙面内质网上合成的。那么，这些蛋白质必然有一个合成后的运输问题。而高尔基体位于质膜和内质网之间，因此它就成了蛋白质运输和分选的中间站。

ER 与高尔基体内侧面间的运输

除了内质网结构和功能蛋白质外，其他由内质网合成的蛋白质都是通过小泡转运到高尔基体的内侧面，小泡与高尔基体内侧网络融合之后，转运的蛋白质进入高尔基体腔，这是内

质网与高尔基体间的主流运输。偶尔也有从高尔基体各个部位形成的小泡沿微管回流到内质网（图 9-32）。

造成高尔基体蛋白质向内质网回流运输的原因有两种可能：一是 ER 在进行蛋白质运输时发生包装错误，将 ER 的结构和功能蛋白质运输到高尔基体，被高尔基体的监控蛋白发现并将“走私”蛋白质遣返；第二种情况是在不良环境下细胞作出的应激反应。

在内质网中合成的蛋白质一般是通过出芽形成小泡运向高尔基体的，据推测：出芽地点应是内质网上的特化区域，在此区域，没有核糖体颗粒的附着。

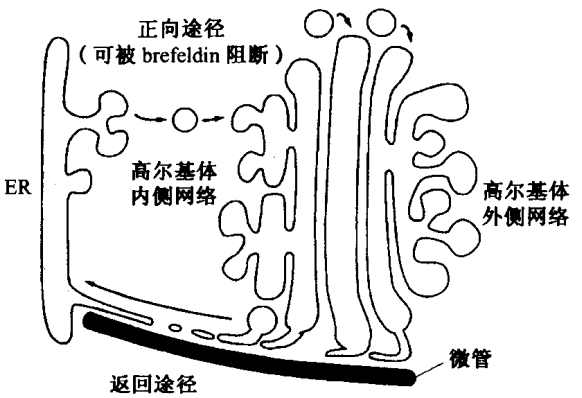


图 9-32　高尔基体和 ER 间的双向运输
（引自 Alberts *et al*., 1994）
从 ER 出芽形成的小泡到高尔基体内侧称为正向运输，从高尔基体形成的小泡都可独立地通过微管运回到 ER。

是什么原因保证蛋白质的正确输出，对于内质网蛋白又不会被输出呢？研究发现：作为内质网的结构和功能蛋白质在其羧基端都有一个内质网滞留信号（ER retention signal）：Lys-Asp-Glu-Leu-COO^-，即 KDEL 信号序列。如 Bip 就带有 KDEL 信号，它是内质网中的分子伴侣，如果从 Bip 上除去这种信号，Bip 蛋白就会分泌出来；如果将 KDEL 信号加到别的分泌蛋白上，这种蛋白质也就变成了滞留在内质网中的蛋白质，因此，KDEL 是内质网滞留信号。

KDEL 信号在高尔基体各个部分的膜上都有相应的受体。如果 ER 滞留蛋白质在出芽时被错误地包进分泌泡而离开了 ER，高尔基体膜上的 KDEL 信号受体蛋白就会与逃出的 ER 蛋白结合，并形成小泡，将这些 ER 蛋白“押送”回到 ER（图 9-33）。另外，从 ER 输出的蛋白质必定是正确折叠的或是正确装配的，否则，就会被 Bip 蛋白结合住，要么重新折叠或装配，要么被水解掉。

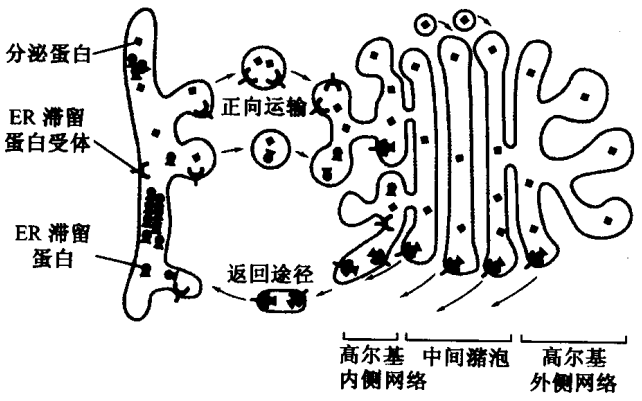


图 9-33　KDEL 信号及其受体维持 ER 蛋白的稳定（引自 Alberts *et al*., 1994）

在病理条件下，高尔基体也可将蛋白质回运到ER。用一种抗生素布雷菲德（brefeldin A）处理细胞，这种药物可以阻断高尔基体的分泌活动。用这种药物处理过的细胞，高尔基体大量消失，而与高尔基体相关的蛋白质和酶又出现在ER中，同ER滞留蛋白质混合在一起。一旦解除药物，高尔基体又恢复正常，高尔基体蛋白质和酶又回到各个区室。

现已知道，抗生素brefeldin A只抑制内质网小泡的形成，而不抑制从外侧高尔基体形成的回流小泡的装配。

蛋白质从高尔基体内侧网络向高尔基体外侧网络运输

从ER分泌出来的小泡同高尔基体内侧网络融合后成为高尔基体的一部分，然后经过中间潴泡出芽形成分泌小泡（又称穿梭小泡），逐步向高尔基体外侧网络转运。转运时，分泌小泡与高尔基体潴泡的融合和出芽都是发生在两侧（图9-34），该过程伴随有蛋白质的各种加工。

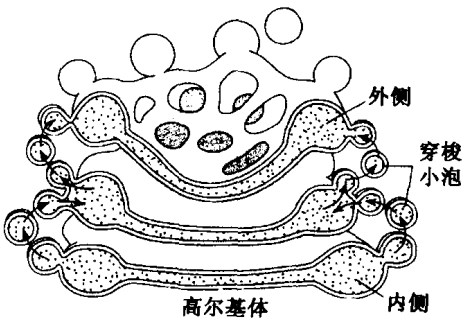


图9-34　穿梭小泡从高尔基体内侧网络向高尔基体外侧网络移动（改自Wolfe，1993）

上述关于分泌蛋白在高尔基体内侧网络和外侧网络之间的运输，长期以来只是一种推测。后来由Rothman和Orci通过无细胞蛋白质合成体系获得了实验证据。他们首先对培养的中国仓鼠卵巢细胞（Chinese hamster ovary cell，CHO）进行诱变，获得一个突变体，该突变体是*N*-乙酰葡萄糖胺转移酶缺陷。在正常细胞中，该酶存在于高尔基体的中间潴泡，可将UDP-*N*-乙酰葡萄糖胺中的*N*-乙酰葡萄糖胺转移到糖蛋白的甘露糖上。实验中还要用一种病毒：水泡性口炎病毒（vesicular stomatitis virus，VSV），一种病原体，它能够编码一种膜整合的糖蛋白（VSV-G），这种蛋白质的糖基化是在高尔基体的中间膜囊中由*N*-乙酰葡萄糖胺转移酶催化的。先用VSV感染突变的CHO细胞，培养后分离感染细胞的高尔基体，同时分离野生型、未经病毒感染的CHO高尔基体。生化分析表明，从野生型CHO中分离的高尔基体中间潴泡中没有VSV-G蛋白，而从感染的突变体CHO细胞中分离的高尔基体中间潴泡中有VSV-G蛋白，但是在甘露糖残基上没有*N*-乙酰葡萄糖胺。

他们将野生型CHO高尔基体作为VSV-G蛋白受体，病毒感染的CHO高尔基体作为VSV-G蛋白供体进行混合，同时添加小泡形成和转移所需的因子，以及放射性标记的*N*-乙酰葡萄糖胺。温育一段时间后再进行分析，发现高尔基体中间潴泡中已有被放射性标记的*N*-乙酰葡萄糖胺修饰的VSV-G蛋白（图9-35），这一结果令人信服地证明来自于内侧小泡中的蛋白质是经中间潴泡传递运输的，并在中间潴泡中被修饰。

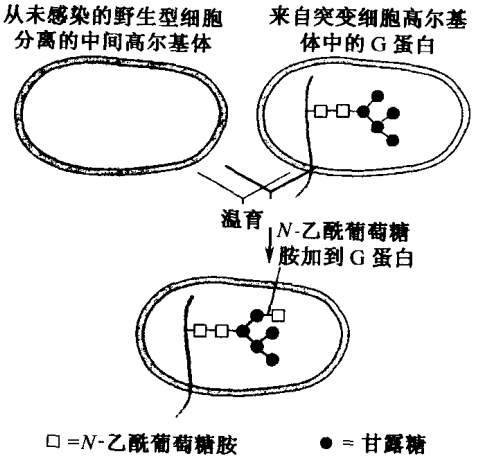


图9-35　无细胞体系证明高尔基体各区室间的蛋白质运输（改自Lodish *et al.*，1999）

9.3.2.2 蛋白质的糖基化

高尔基体对蛋白质的糖基化修饰作用是在高尔基体的各个特异的功能区室（functional compartments of the Golgi apparatus）中进行的。动物细胞中的糖蛋白主要位于细胞质膜、溶酶体、分泌产物中。在内质网中合成的蛋白质大多已就地进行了糖基化，但需要进一步加工。

细胞内 *N*-糖基化主要有两种，一种是高甘露糖寡聚糖（high-mannose oligosaccharide）；另一种是复合寡糖（complex oligosaccaride）。前者含有 *N*-乙酰葡萄糖胺和很多甘露糖；后者除了 *N*-乙酰氨基葡萄糖胺外，还含有半乳糖、唾液酸和岩藻糖。蛋白质在内质网中的糖基化主要是 *N*-连接的糖基化，其糖基是从多萜醇上转移过来的。转移到多肽链上的多糖最初有 2 分子的 *N*-乙酰葡萄糖胺、9 分子甘露糖和 3 分子葡萄糖。对于糖蛋白中的寡糖侧链来说，3 分子葡萄糖和一些甘露糖是多余的，在加入其他糖基前必须切除。其中葡萄糖分子和个别甘露糖分子在内质网中就被切除，其余的甘露糖在高尔基体中被切除。

对于进入到高尔基体的糖蛋白来说，形成高甘露糖基寡糖侧链所需要的修饰比较简单，只要切除 3 分子的甘露糖即可。而形成复合寡糖则比较复杂，要切除 5 分子甘露糖，加上 2 分子 *N*-乙酰葡萄糖胺、2 分子半乳糖、2 分子唾液酸（图 9-36），有时还要加上岩藻糖。

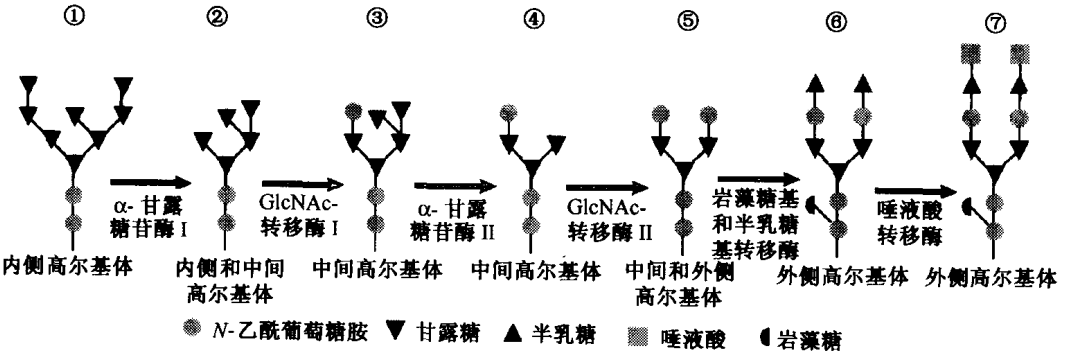


图 9-36 哺乳动物高尔基体中进行的 *N*-连接糖基化修饰过程（引自 Karp，1999）

高尔基体中进行的另一种蛋白质的糖基化是 *O*-糖基化，将糖链转移到多肽链的丝氨酸、苏氨酸或羟赖氨酸的羟基的氧原子上。*O*-糖基化是由不同的糖基转移酶催化，每次加上一个单糖。同复杂的 *N*-糖基化一样，最后一步是加上唾液酸残基，这一反应发生在高尔基体外侧膜囊和 TGN 中。

内质网和高尔基体中所有已知的糖基转移酶都是整合蛋白，它们固定在细胞不同区室中，其活性部位均位于内质网或高尔基体的腔面。在高尔基体中，其反应底物——核糖是通过载体蛋白介导的反向协同运输的方式从细胞质基质运到高尔基体腔中（图 9-37）。在不同的区室中，膜上的载体蛋白也有所不同，以维持腔内特定反应物的浓度。

9.3.2.3 蛋白聚糖的合成

除了蛋白质的糖基化以外，高尔基体中也可以进行蛋白聚糖的合成。动物细胞中合成的多糖主要是透明质酸，这是一种氨基聚糖，是细胞外基质的主要成分。植物细胞壁中的几种

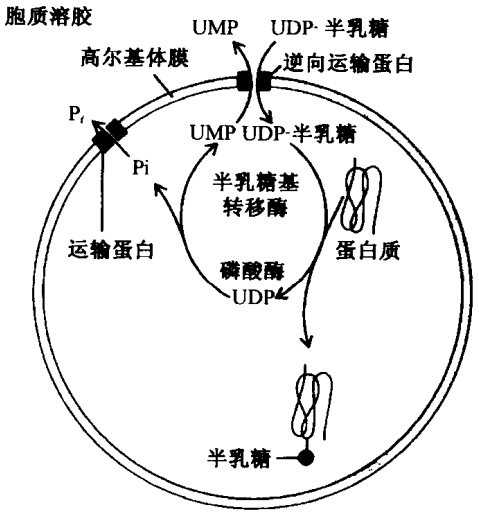


图 9-37　高尔基体膜上进行的运输
（引自 Lodish *et al*.，1999）
胞质溶胶中的 UDP-半乳糖通过与膜内 UMP 逆向交换的形式进入高尔基体小泡，UMP 是由 UDP 脱磷酸产生的，UDP-半乳糖上的糖通过糖基转移酶加到糖蛋白分子中。

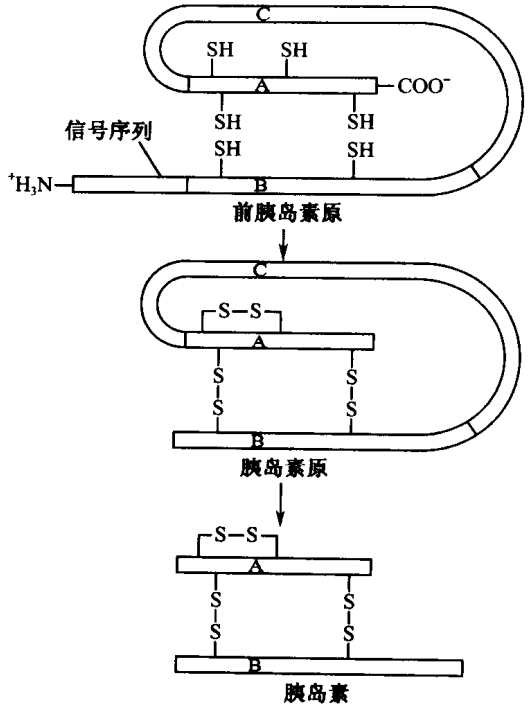


图 9-38　胰岛素分子的加工成熟和运输
（引自 Becker *et al*.，1996）

多糖，包括半纤维素、果胶也是在高尔基体中合成的。

9.3.2.4　蛋白原的水解

有些分泌产物在其刚从内质网中合成时是较大分子的蛋白原，这些蛋白原被送到高尔基体后通过蛋白水解作用，形成成熟的分泌蛋白。胰岛素的合成就是一个典型的例子。胰岛素是在胰岛 B 细胞中合成的，刚从内质网合成的多肽在 N 端有信号肽链，称前胰岛素原（pre-proinsulin），分子质量为 12kDa。随后在内质网的信号肽酶的作用下，切除信号肽，称为胰岛素原（proinsulin），分子质量 9kDa，含 84 个氨基酸。运输到区室后，通过蛋白酶水解作用，生成一个分子由 51 个氨基酸残基组成的胰岛素（图 9-38）和一个分子 C 肽，最后通过小泡分泌出来。胰岛素分子中的二硫键是在内质网中形成的。

9.3.2.5　蛋白质的分选

从 ER 分泌出来的蛋白质经过高尔基体的不同区室进行加工并逐步转运到高尔基体外侧网络（TGN），在此必须进行分选，然后集中形成不同的分泌小泡运送到不同的目的地。由于细胞质膜的蛋白质、溶酶体酶蛋白、细胞外基质蛋白都是在膜结合核糖体上合成的，并全部进入内质网的腔，最终在 TGN 集结，所以 TGN 必然有一种机制将这些蛋白质分开，TGN

的这种功能称为蛋白质的分选作用（图 9-39）。

分选作用主要是由信号序列和受体之间的相互作用决定的，如 KDEL 序列是内质网的滞留信号一样，不同部位的蛋白质具有不同的滞留信号，分选包装到不同的小泡，没有特别信号的则进入非特异的分泌小泡。

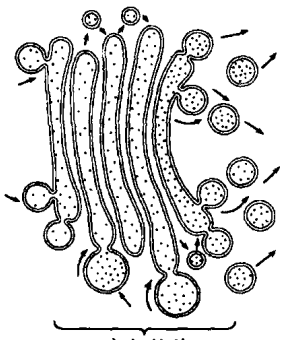


图 9-39 高尔基体外侧网络的蛋白质分选作用（改自 Wolfe, 1993）

9.4 溶 酶 体

溶酶体（lysosome）是动物细胞中一种膜结合细胞器，小球状，外面由一层单位膜包被。溶酶体含有多种水解酶类，在细胞内起消化和保护作用，可与吞噬泡或胞饮泡结合，消化和利用其中的物质。也可以消化自身细胞破损的细胞器或残片，有利于细胞器的重新组装、成分的更新及废物的消除。当细胞被损伤时，溶酶体可释放出水解酶类，使细胞自溶。溶酶体来自高尔基体，溶酶体的酶有一个基本的特征，即它们的寡糖链有磷酸化甘露糖残基，被 TGN 的 M6P 受体识别和结合，从而被分拣出来。

植物细胞中也有与溶酶体功能类似的细胞器，如圆球体、糊粉粒以及中央液泡等。

9.4.1 溶酶体的形态结构

9.4.1.1 溶酶体的形态

溶酶体是一种异质的（heterogeneous）的细胞器，不同来源的溶酶体形态、大小，甚至所含有酶的种类都有很大的不同。溶酶体是一种动态的结构，它不仅在同类型的细胞中形态大小不同，而且在同一类细胞的不同发育阶段往往也不同。溶酶体呈小球状，大小变化很大，直径一般 0.25～0.8μm，最大的可超过 1μm，最小的直径只有 25～50nm。图 9-40 是肝组织的 Kupper 细胞（肝星形细胞）中不同大小的溶酶体，该细胞主要是吞噬衰老的红细胞。

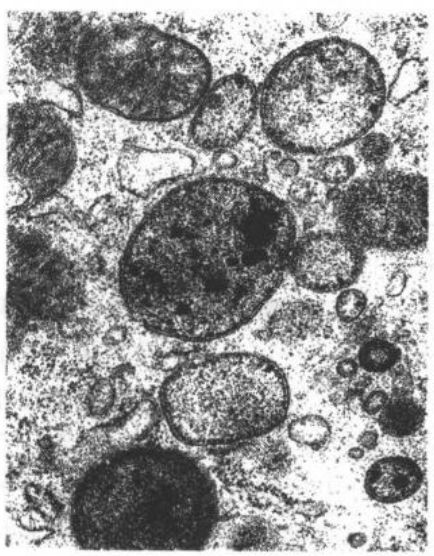


图 9-40 溶酶体的形态大小（引自 Karp, 1996）
具吞噬作用的肝 Kupper 细胞中不同大小的溶酶体，图中示出至少 10 个不同大小的溶酶体。

9.4.1.2 溶酶体膜的稳定性

溶酶体的外被是一层单位膜，内部没有任何特殊的结构。由于溶酶体中含有各种不同的水解酶类，所以溶酶体在生活细胞中必须是高度稳定的。溶酶体的稳定性与其膜的结构组成有关：①溶酶体膜含有各种不同酸性的、高度糖基化的膜整合蛋白，这些膜整合蛋白的功能可能是保护溶酶体的膜免遭溶酶体内酶的

攻击，有利于防止自身膜蛋白的降解。②溶酶体的膜中含有较多能促进膜稳定的胆固醇。另外，溶酶体膜中嵌有质子运输泵（H^+-ATPase），借助水解 ATP 释放出的能量将 H^+ 泵入溶酶体内，使溶酶体中的 H^+ 浓度比细胞质中的 H^+ 浓度高得多；同时，在溶酶体膜上有 Cl^- 通道蛋白，可向溶酶体中运输 Cl^-，两种运输蛋白作用的结果，就等于向溶酶体中运输了 HCl，以此维持溶酶体内部的酸性环境（pH 值约为 4.6～4.8）。

9.4.2 溶酶体的发现与溶酶体的酶类

溶酶体内含有 50 多种酶类，其中包括酯酶、蛋白水解酶、核酸酶、磷酸酯酶、糖苷酶和硫酸酯酶等。这些酶的最适 pH 值是 5.0，故均为酸性水解酶（acid hydrolase）。少量的溶酶体酶泄漏到胞质溶胶中，并不会引起细胞损伤，其主要原因是胞质溶胶中的 pH 值为 7.0 左右，在这种环境下，溶酶体的酶基本没有活性。图 9-41 是典型的溶酶体的大小、所含主要酶类及膜中的 V 型质子泵等。

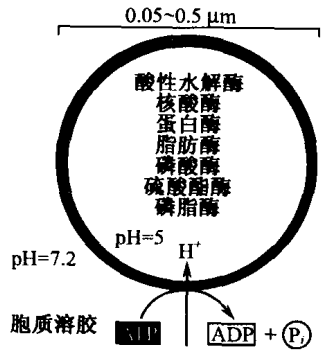


图 9-41 溶酶体的形态、大小及所含主要酶类

酸性磷酸酶是溶酶体的标志酶，正是对这种酶的定位研究导致溶酶体的发现。

9.4.2.1 酸性磷酸酶的定位研究与溶酶体的发现

在 20 世纪的 50 年代初期，de Duve 和他的同事在研究亚细胞组分时发现了溶酶体，不过，溶酶体的发现带有很大的偶然性。de Duve 对胰岛素在糖代谢中的作用很感兴趣，他打算通过对葡萄糖-6-磷酸酶在细胞内的定位来研究胰岛素对糖代谢的影响，该酶在细胞内的作用是向血液中释放葡萄糖。在实验中，他们选用酸性磷酸酶作为对照，因为酸性磷酸酶并不参与糖的代谢。他们先用 0.25mol·L^{-1}的蔗糖对肝组织进行匀浆，然后用差速离心分离细胞组分。实验中发现葡糖-6-磷酸酶总是与微粒体在一起被分离。这一发现非常重要，因为当时人们普遍认为微粒体就是破碎的线粒体囊泡，由于葡萄糖-6-磷酸酶只与微粒体相关，并不与线粒体一起被分离，这就有理由推测，微粒体是不同于线粒体的细胞结构。

另一方面，他们发现虽然在离心分离的线粒体组分中酸性磷酸酶的浓度最高，但也只占肝细胞中酸性磷酸酶总量的 10%，还有 90%的酸性磷酸酶在离心分离过程中是如何分布的并不了解。当时他并没有重新分析实验结果，因为时间太晚了，于是他们将样品放在低温下冷冻起来。可是，几天后当他重新分析分离样品的酸性磷酸酶时，发现活性比原来高出了 10 倍。于是 de Duve 推测：某些酸性磷酸酶在分离的线粒体组分中可能被“隐藏”了，在冷冻过程中酸性磷酸酶被某种因素激活。于是他对冷冻的线粒体分离样品重新离心，将线粒体沉淀后分析上清液中酸性磷酸酶的活性，发现上清液中的酸性磷酸酶的活性提高了，这就是说，冷冻后酸性磷酸酶活性的提高主要是由于可溶性的酸性磷酸酶量的增加。

虽然这一发现与 de Duve 原来的研究目的无关，但是他决定继续研究下去，因为他意识到这种发现有某种重要性。他很快发现除了冷冻之外还有其他的一些处理也可以提高酸性磷

酸酶的活性。他们发现在样品匀浆过程中，通过冷冻、加热、添加去垢剂等都能够提高肝组织匀浆液中酸性磷酸酶的活性。由于所采取的措施都是促进膜的破裂，于是推测：酸性磷酸酶位于膜结合的细胞器中，因为他们用于分析酸性磷酸酶活性的底物都是不能通过扩散穿过膜的双脂层，只有膜破裂之后待酸性磷酸酶释放到溶液中才能测到酶的活性（图 9-42）。

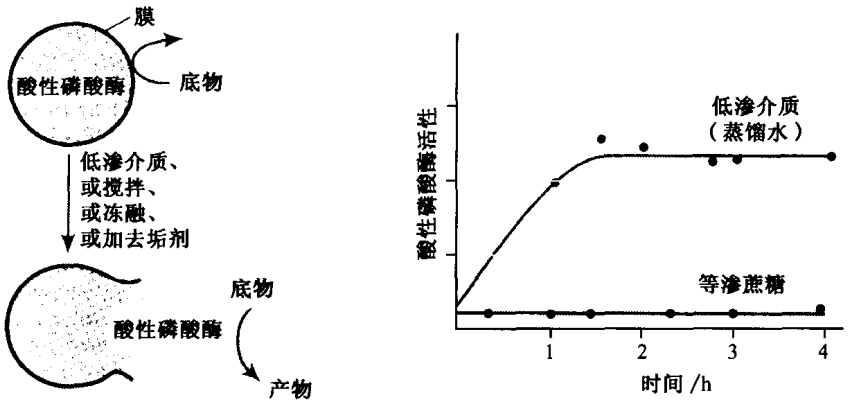


图 9-42　酸性磷酸酶存在于膜结合小泡中的实验证明（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）
左：造成膜泡破裂及酸性磷酸酶释放的条件；右：将鼠肝的线粒体分离组分置于低渗条件下检测的酸性磷酸酶的活性曲线。

细胞内有很多种膜结合细胞器，酸性磷酸酶到底存在于何种膜结合细胞器中？de Duve 原先将酸性磷酸酶定位在线粒体中，后来在一次偶然的实验中，否定了这一假设。他的一位学生在离心分离线粒体时，并没有用超速离心而是用了较低的速度，这种较低速度的离心同样分离到大量的线粒体组分，但是在收集的线粒体组分中没有可检测的酸性磷酸酶的活性。这种偶然的发现导致 de Duve 相信酸性磷酸酶位于其他的膜结合细胞器中。

为了验证这一想法，他重新设计了分离线粒体的离心分离方法，按照原先的方法分离线粒体组分后，再调整离心速度重新进行离心分离，得到大小两部分（fraction），发现与线粒体功能有关的酶，如细胞色素氧化酶，存在于大的部分中，而酸性磷酸酶和另一些水解酶类（核糖核酸酶、脱氧核糖核酸酶、β-葡萄糖醛酸酶、组织蛋白酶）一起存在于小的部分中，由于这 5 种酶都是小分子的水解酶，于是 de Duve 认为大的部分是真正纯化的线粒体，而小的部分在细胞内行使消化作用，1955 年他将这一部分命名为溶酶体。需要说明的是，de Duve 发现的只是生化证据，并没有看到真正的溶酶体，在电子显微镜下观察到溶酶体是后来的事。

9.4.2.2　溶酶体的酶

后来的研究发现，溶酶体含有除了 de Duve 所发现的 5 种酶外，还有其他一些酶类，约 50 余种。溶酶体的酶都有一个共同的特点：都是水解酶类，在酸性 pH 条件下具有最高的活性。溶酶体的酶包括：蛋白酶、核酸酶、脂酶、糖苷酶等，主要类型的酶列于表 9-8。

表 9-8　溶酶体的主要酶类

酶	天然底物
磷酸酶类	
酸性磷酸酶	磷酸单酯
酸性焦磷酸酶	ATP，FAD
磷酸蛋白磷酸酶	磷酸蛋白
酸性磷酸二酯酶	磷酸二酯
磷脂酸磷酸酶	磷脂酸
硫酸酯酶	
芳基硫酸酯酶	芳基硫酸酯
蛋白酶和肽酶	
组织蛋白酶	蛋白质
肽酶	肽
胶原酶	胶原
核酸酶	
核糖核酸酶	RNA
脱氧核糖核酸酶	DNA
脂酶	
磷酸脂酶	磷脂
β-葡萄糖脑苷脂酶	葡萄糖脑苷脂
酯酶	脂肪酸酯
糖苷酶	
α葡萄糖苷酶	糖原
β葡萄糖苷酶	糖蛋白
β-半乳糖苷酶	糖脂、糖蛋白
溶菌酶	细菌的细胞壁

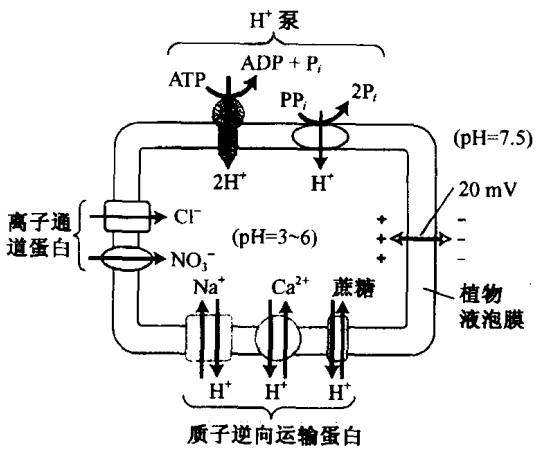


图 9-43　植物液泡膜的运输系统及液泡内离子和蔗糖浓度梯度的建立（引自 Lodish *et al*., 1995）

液泡膜含有两种类型的质子泵：V 型 H^+-ATPase 和单向焦磷酸水解质子泵。这两种泵可以维持液泡中低 pH，并建立正电动势，促使 Cl^- 和 NO_3^- 从离子通道蛋白进入液泡。通过 H^+ 质子梯度的力，促使 Na^+、Ca^{2+} 和蔗糖从胞质溶胶运入液泡。

9.4.2.3　植物溶酶体

圆球体（spherosome）是植物细胞中由一层单位膜包裹的含有细微结构的球形颗粒，直径为 0.5～1μm，内含酸性水解酶，相当于动物细胞的溶酶体。

与动物细胞的溶酶体不同，圆球体能够被脂溶性的染料染色，因此推测圆球体含有大量的脂类成分。由于含有大量的脂，有理由推测圆球体的功能可能是参与脂的储存。

植物细胞的液泡（vacuole）几乎占据了细胞总体积的 90%，并且具有十分重要的作用。细胞内许多溶质和大分子，包括离子、糖、氨基酸、蛋白质和多糖等都是暂时储存在液泡中。植物细胞的液泡也含有多种水解酶类，具有与动物细胞溶酶体酶类似的功能。液泡膜上具有 H^+-ATPase，

能够将 H^+ 运输到液泡中，同时在液泡膜上还有一些运输蛋白，帮助液泡行使一些特殊的功能（图 9-43）。

9.4.3 溶酶体的类型

由于溶酶体在形态上的多样性和异质性，曾发现各种不同类型的溶酶体。根据溶酶体处于完成其生理功能的不同阶段，大致分为以下几种。

9.4.3.1 初级溶酶体

此类溶酶体是刚刚从外侧高尔基体形成的小囊泡，仅含有水解酶类，但无作用底物，外面只有一层单位膜，其中的酶处于非活性状态。如果从细胞的分泌活动考虑，初级溶酶体（primary lysosome）是一种刚刚分泌的含有溶酶体酶的分泌小泡。

9.4.3.2 次级溶酶体

次级溶酶体（secondary lysosome）中含有水解酶和相应的底物，是一种将要或正在进行消化作用的溶酶体。根据所消化的物质来源不同，分为自噬性溶酶体、异噬性溶酶体。

（1）自噬性溶酶体　自噬性溶酶体（autolysosome）是一种自体吞噬泡，作用底物是内源性的，即细胞内的蜕变、破损的某些细胞器或局部细胞质。这种溶酶体广泛存在于正常的细胞内，在细胞内起“清道夫”作用，作为细胞内细胞器和其他结构自然减员和更新的正常途径。在组织细胞受到各种理化因素伤害时，自噬性溶酶体大量增加，因此对细胞的损伤起一种保护作用。

（2）异噬性溶酶体　又称异体吞噬泡，它的作用底物是外源性的，即细胞经吞噬、胞饮作用所摄入的胞外物质。异噬性溶酶体（heterolysosome）实际上是初级溶酶体与内吞泡融合后形成的。

9.4.4 溶酶体的功能

溶酶体的主要功能是消化作用（图 9-44）。其消化底物的来源有 3 种途径：①自体吞噬（autophagy），吞噬的是细胞内原有的物质；②吞噬体（phagosome）吞噬的有害物质；③内吞作用（endocytosis）吞入的营养物质。由于吞噬作用和内吞作用提供的被消化的物质都是来自细胞外，又将这两种来源的物质消化作用统称为异体吞噬（heterophagy）。

溶酶体除了具有吞噬消化作用外，还具有自溶作用，即某些即将老死的细胞是靠溶酶体破裂释放溶酶体的酶将自身消化。另外，溶酶体的酶也可释放到细胞外，对细胞外基质进行消化。

9.4.4.1 吞噬作用

细胞吞噬感染的病毒、细菌或其他一些颗粒等称为异体吞噬。通过溶酶体的吞噬作用保护细胞免受细菌与病毒等的侵染，是细胞的防御功能所必需的。外来的有害物质被吞入细胞

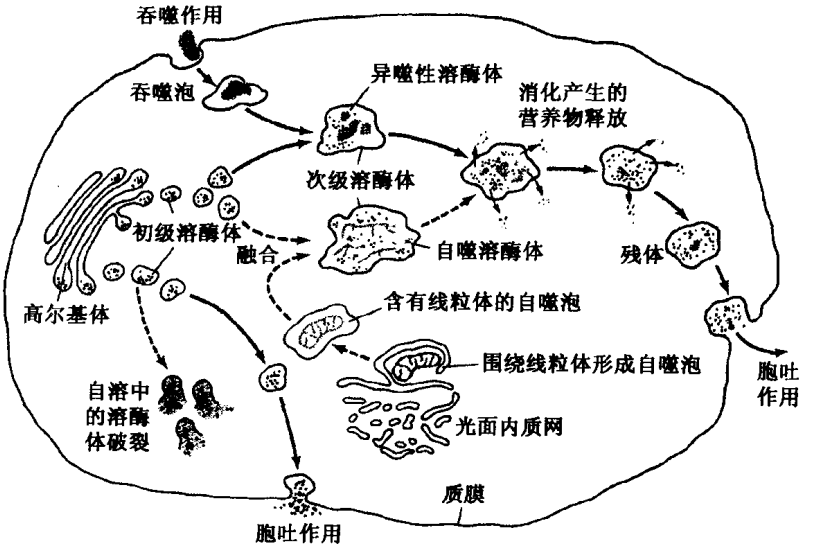


图 9-44　初级和次级溶酶体的形成以及它们在细胞的消化过程中的作用
(引自 Becker *et al*., 1996)

后，即形成由膜包裹的吞噬体，初级溶酶体很快同吞噬体融合形成次级溶酶体，此时溶酶体中的底物是从细胞外摄取的，故为异噬性的溶酶体，在异噬性的溶酶体中吞噬物被酶水解(图 9-45)；水解后，那些可溶性小分子可通过溶酶体膜进入胞质溶胶，为细胞再利用或成为废物被排出。

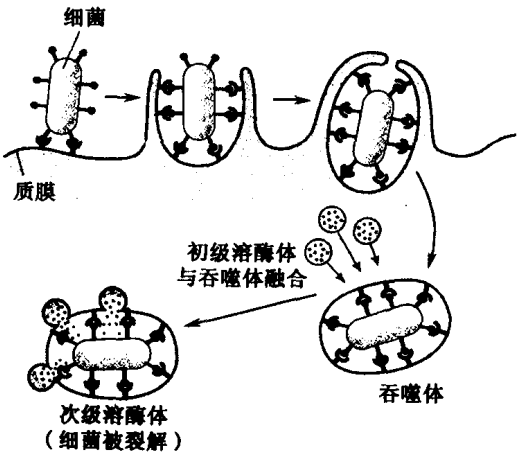


图 9-45　吞噬作用
吞噬作用(phagocytosis)的第一阶段是细胞质膜上的受体与细菌结合，然后将被感染的细菌包裹起来形成吞噬体，接着是溶酶体与吞噬体融合，通过溶酶体酶的作用将被吞噬的细菌降解。

多细胞的动物具有专门的吞噬细胞，即巨噬细胞（macrophage）和嗜中性粒细胞（neutrophil）担任机体的保护防御任务。在细胞的吞噬过程中，如果吞进来的是液体则称为吞饮作用，这种作用形成的内吞泡也是通过与溶酶体融合将液体中的物质水解。吞噬作用也是细胞获取营养的一种方式，细胞通过内吞作用将一些营养物质包进内吞体，最后与溶酶体融合，在溶酶体酶的作用下，将吞进的营养物质消化形成可直接利用的小分子用于合成代谢。一些单细胞的生物更是靠吞噬作用来获取营养。

吞噬作用也包括对衰老的、进入编程死亡的细胞的吞噬。如占成人细胞总数 1/4 的红细胞仅能成活 120d，因此人体每天必须清除大量衰老的红细胞，这主要是靠吞噬作用即溶酶体酶的消化作用来完成。

9.4.4.2 自噬作用

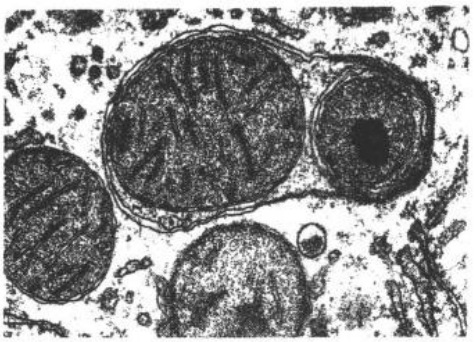


图 9-46 自噬作用（引自 Karp, 1996）
电镜照片所示是衰老的线粒体和过氧化物酶体被包裹在一个双层膜结构中，该膜来自于内质网。被 ER 膜包裹而成的自噬体将会与溶酶体融合，进而被溶酶体酶降解。

自噬作用（autophagy）是普遍存在于大部分真核细胞中的一种现象，是溶酶体对自身结构的吞噬降解，它是细胞内的再循环系统（recycling system）。

自噬作用主要是清除降解细胞内受损伤的细胞结构、衰老的细胞器以及不再需要的生物大分子等（图 9-46）。自噬作用在消化的同时，也为细胞内细胞器的构建提供原料，即细胞结构的再循环。因此，溶酶体相当于细胞内清道夫。

处于不同的细胞周期、不同分化阶段和不同生理状态下的细胞，进行着不同的生理生化反应，需要不同的酶系统，细胞生理状态的变化要依靠酶系统的变化来实现。对于细胞质中某些暂时不需要的酶系统或代谢产物，需要通过自噬作用进行酶系统的更新。

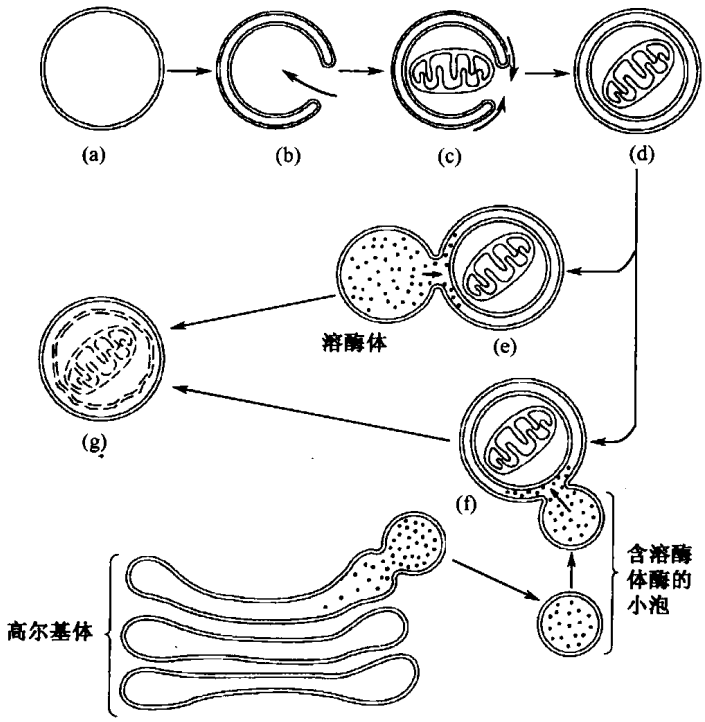


图 9-47 自体吞噬泡形成的机制（引自 Wolfe, 1993）
(a), (b) 内质网形成一个双膜的杯形结构；(c) 衰老的细胞器（线粒体）从杯口进入；(d) 然后封口；(e) 形成双膜的小泡；小泡与成熟的溶酶体融合；(f) 或与来自高尔基体分泌的含溶酶体酶的小泡融合；(g) 溶酶体的酶降解融合泡中的底物。

细胞中的生物大分子和细胞器都有一定的寿命，为了保证细胞正常的代谢活动，必须不断地清除衰老的细胞器和生物大分子。很多生物大分子的半寿期只有几小时或几天。肝细胞中线粒体的寿命平均约 10d 左右。

由于溶酶体的膜十分稳定，并且溶酶体的酶不能轻易释放到胞质溶胶中进行消化作用，所以老的、不用的细胞器和生物大分子先要被内质网的膜包裹起来形成自噬泡（autophagic vacuole）（图 9-47），然后与初级溶酶体融合形成次级溶酶体，即自噬性的溶酶体，融合后的底物被溶酶体酶消化。

自噬作用在不同类型细胞中发生的频率不同。在某些发育阶段的细胞中，自噬作用特别强，因为这些细胞要不断地进行细胞器的更新或消除。如红细胞发育成熟后，所有的细胞器都要通过自噬作用被清除。另外在细胞饥饿条件下，自噬作用也特别强，此时的吞噬作用主要是为细胞提供能量，维持细胞的生命活动。

9.4.4.3 自溶作用

自溶（autolysis）是细胞的自我毁灭（cellular self-destruction），即溶酶体将酶释放出来将自身细胞降解。在正常情况下，溶酶体的膜是十分稳定的，溶酶体的酶也安全地被包裹在溶酶体内，不会对细胞自身造成伤害。另外，溶酶体在进行异体吞噬和自体吞噬时，都要先形成吞噬泡，通过融合形成次级溶酶体后才能进行降解作用，这样溶酶体的酶始终在安全条件下进行消化作用。

如果细胞受到严重损伤，造成溶酶体破裂，那么细胞就会在溶酶体酶的作用下被降解。

在多细胞生物的发育过程中，自溶对于形态建成具有重要作用。通过自溶作用，除去不必要的细胞、组织。如手指或足趾的形成同溶酶体有关，它将指之间的结构水解。另外蝌蚪尾巴的蜕化也是溶酶体中一种水解酶（组织蛋白酶）消化作用的结果，该酶将尾部细胞破坏，使尾部消失。

9.4.4.4 其他功能

在分泌蛋白质激素和分泌类固醇激素的细胞中，溶酶体参与激素的分泌调节作用。这种调节作用是通过分泌自噬泡进行的，即通过自体吞噬作用将一部分合成类固醇激素的细胞器（光面内质网、线粒体）包裹起来，形成自噬体，由溶酶体将这部分细胞器和其中已合成的激素消除掉。这种自吞噬作用使细胞能在短时间内消除一部分合成激素的细胞器和其中的激素，从而使分泌类固醇激素的细胞及时有效地调节激素分泌量。

另外，溶酶体除了在细胞内具有消化作用，也具有细胞外消化作用（extracellular digestion）。如在精子与卵子的受精作用就是靠精子头部的顶体（acrosome）释放溶酶体酶帮助精子抵达卵子质膜，进行卵子和精子的细胞质膜相互融合，达到受精的目的。

9.4.5 溶酶体的生物发生

溶酶体的形成是一个相当复杂的过程，涉及的细胞器有内质网、高尔基体和内体等。比较清楚的是 6-磷酸甘露糖途径：溶酶体的酶类在内质网上起始合成，跨膜进入内质网的腔，

在顺面高尔基体带上 6-磷酸甘露糖标记后在高尔基体内侧网络形成溶酶体分泌小泡，最后还要通过脱磷酸才成为成熟的溶酶体（图 9-48）。

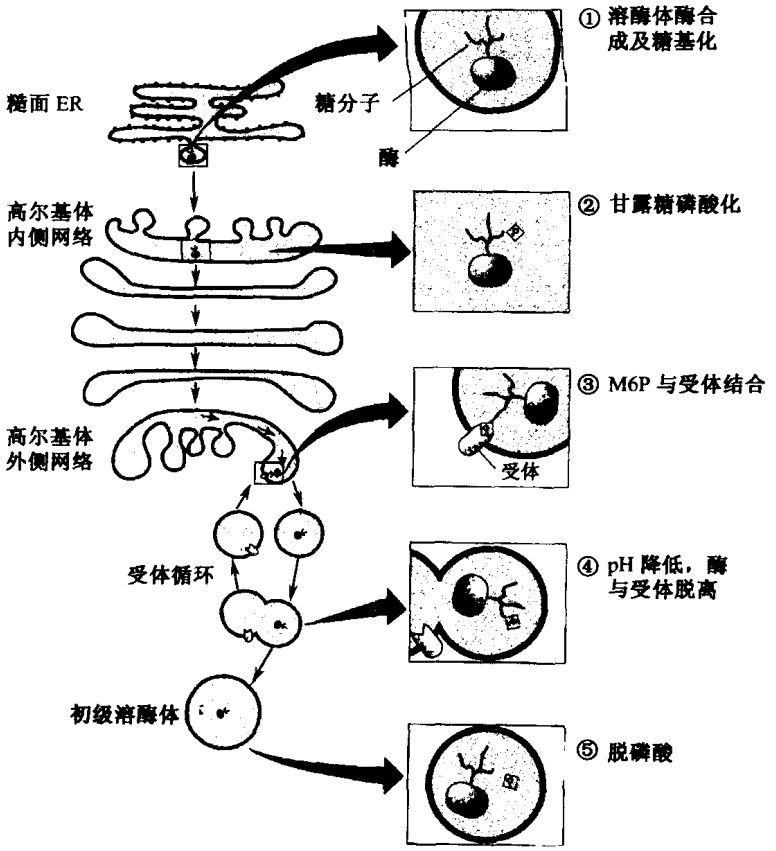


图 9-48　溶酶体的酶寻靶过程、涉及的细胞器及机理（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）
大多数溶酶体的酶在寡糖链上含有甘露糖，在高尔基体内侧网络转变成 6-磷酸甘露糖。新形成的溶酶体的酶通过高尔基体，在高尔基体内侧网络与膜受体结合后被包进溶酶体分泌小泡，通过出芽形成自由的分泌泡。通过 H^+-质子泵调节溶酶体分泌小泡中的 pH，使溶酶体的酶同受体脱离，受体再循环，溶酶体酶脱磷酸后成为成熟的初级溶酶体。

9.4.5.1　溶酶体酶蛋白的 M6P 标记

由于溶酶体的酶都是水解酶类，对细胞内的结构和化学组分具有破坏作用，所以它的形成必须有独特的机制加以保护。研究发现，溶酶体的酶上都有一个特殊的标记：甘露糖 6-磷酸（mannose 6-phosphate，M6P），这一标记是溶酶体酶合成后在糙面内质网和高尔基体通过糖基化和磷酸化添加上去的。

溶酶体的酶蛋白在膜旁核糖体上合成，通过信号肽的引导进入糙面内质网，在糙面内质网进行 *N*-糖基化。在此过程中，溶酶体酶蛋白先带上 3 个葡萄糖、9 个甘露糖和 2 个 *N*-乙酰葡萄糖胺。然后切除 3 分子葡萄糖和 1 分子甘露糖后转运到高尔基体；在高尔基体内侧网络对 *N*-连接的糖链进行磷酸化修饰，带上甘露糖 6-磷酸的标记。

溶酶体酶蛋白的一级结构上通常有几段信号序列，在磷酸化时可形成信号斑（signal patch），它是一个三维的表面结构，能够同磷酸转移酶特异性结合（图 9-49）。

图 9-49　信号斑（引自 Alberts *et al*., 1994）

溶酶体蛋白的多肽上有 3 段信号序列，通过折叠，3 个信号序列相互靠近形成信号斑结构。

将磷酸基团添加到溶酶体酶的甘露糖的第 6 位碳上的反应是由两种酶催化的，第一种是 *N*-乙酰葡萄糖胺磷酸转移酶（*N*-acetyglucosamine phosphotransferase），它有两个功能位点，一个是识别位点，能够同溶酶体酶的信号斑进行特异性结合；另一个催化位点，进行磷酸的转移。第二种酶是 *N*-乙酰葡萄糖苷酶，功能是将 *N*-乙酰葡萄糖胺切除（图 9-50）。

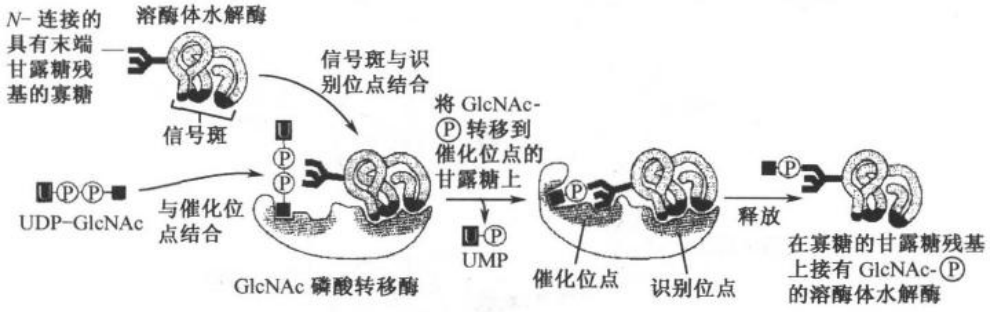


图 9-50　溶酶体酶蛋白信号斑的作用（引自 Alberts *et al*., 1994）

内侧高尔基体中的 *N*-乙酰葡萄糖胺磷酸转移酶有两个功能位点，一个识别位点能够识别信号斑并与之结合；催化位点与高甘露糖 *N*-连接的寡聚糖以及 UDP-GlcNAc 结合。

反应中磷酸基的供体是 UDP-*N*-乙酰葡萄糖胺（*N*-acetyglucosamine，GlcNAc），甘露糖残基磷酸化的位点是第 6 位碳原子。每个溶酶体酶蛋白上有 8 个甘露糖残基，至少有一个甘露糖残基被磷酸化，也会有多个甘露糖残基磷酸化的情况发生。溶酶体酶蛋白的甘露糖一旦被磷酸化，就带上了 6-磷酸标记（图 9-51），通过这种修饰作用，内侧高尔基体中的 pH 由 7 转变成 6。

9.4.5.2　溶酶体酶的甘露糖 6-磷酸分选途径

溶酶体的酶在高尔基体内侧面带上甘露糖 6-磷酸标记后被转运到高尔基体内侧网络进行分选。这种分选作用是靠一种特殊的蛋白：M6P 受体蛋白（M6P receptor protein）完成的。

M6P 受体蛋白是高尔基体外侧网络上的膜整合蛋白，能够识别溶酶体水解酶上的 M6P 信号并与之结合，从而将溶酶体的酶蛋白分选出来，然后通过出芽的方式将溶酶体的酶蛋白装入分泌小泡。M6P 受体蛋白同 M6P 的结合是高度特异的，并且具有较高的结合力。它在 pH 为 6.5～7 的条件下与 M6P 结合，而在酸性条件下（pH＝6）脱落。

M6P 受体蛋白主要存在于高尔基体的外侧网络，但在一些动物细胞的质膜中发现有很多

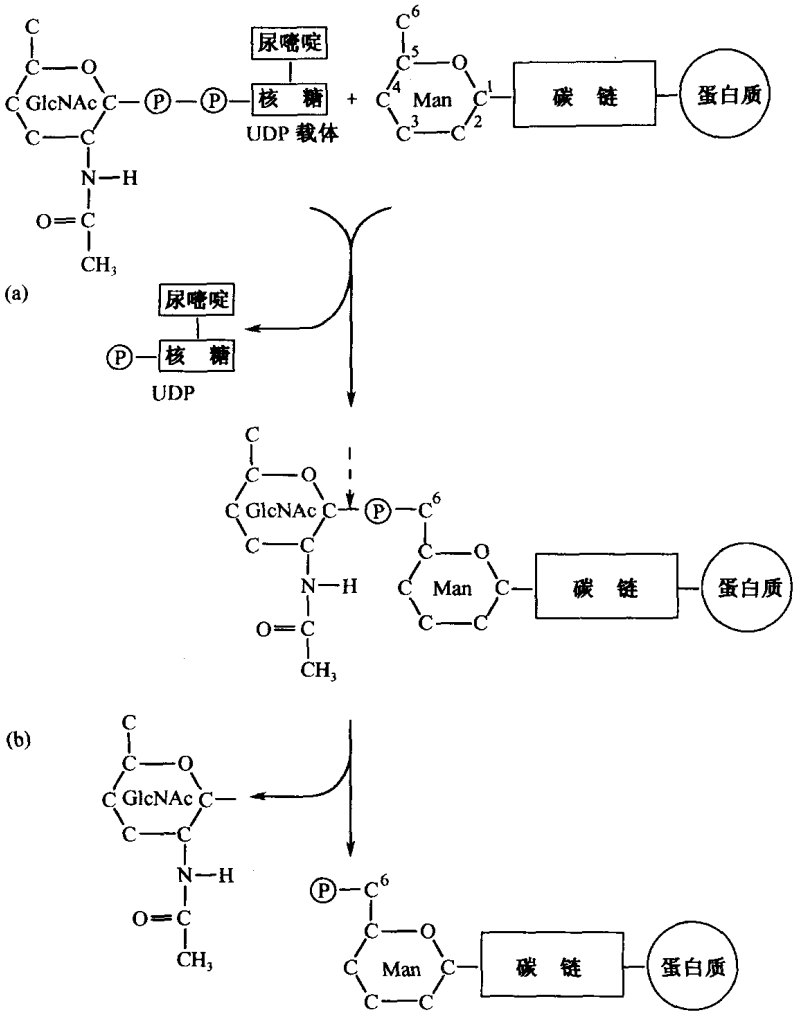


图 9-51 溶酶体酶蛋白甘露糖残基磷酸化的生化反应

M6P 受体蛋白的存在，这可能是细胞的一种保护机制，可防止溶酶体的酶不正确地分泌到细胞外。细胞质膜表面 pH 呈中性，溶酶体的酶蛋白在这种条件下与 M6P 受体紧紧地结合在一起，可通过内吞作用将分泌出来的溶酶体酶重新包装在小泡中并送回到细胞内。大多数这样的小泡能够与溶酶体或高尔基体的 TGN 融合。据估计大约有 5%～10%的溶酶体酶是通过这种方式从细胞外送到细胞内。图 9-52 综合了溶酶体酶的甘露糖 6-磷酸分选途径和溶酶体形成的主要过程。

溶酶体形成的 M6P 分选途径的主要过程是：具有 M6P 标记的溶酶体酶在高尔基体外侧网络与受体结合后，在网格蛋白帮助下形成具有网格蛋白外被的溶酶体酶分泌小泡，网格蛋白解聚后的溶酶体酶分泌小泡与具有分选作用的细胞器——次级内体融合，由于次级内体内部的 pH 约 5.5，融合后的内体中的 pH 低于 6，所以与 M6P 受体结合的溶酶体酶与受体脱离，释放到内体中；接着，由次级内体中的磷酸酶使溶酶体酶脱磷酸，防止溶酶体酶与 M6P 受体重新结合。融合后的次级内体可以通过出芽形成两种类型的小泡，一种是含有溶酶体酶

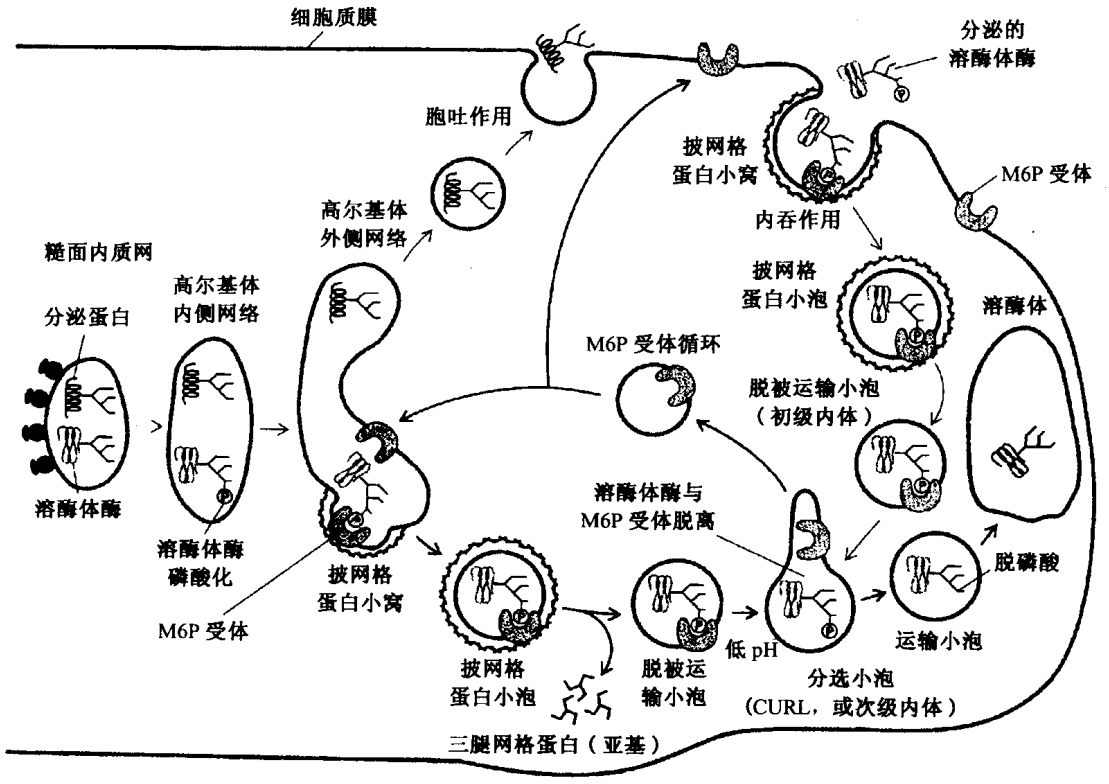


图 9-52　甘露糖 6-磷酸分选途径和溶酶体形成的主要过程（引自 Lodish *et al*., 1995）

溶酶体酶前体从糙面内质网转移到内侧高尔基体，并进行甘露糖残基的磷酸化。在高尔基体外侧网络，磷酸化的酶同 M6P 受体结合，通过该受体将溶酶体的酶包装到由纤维状网格蛋白包被的小泡中，然后网格蛋白外被很快解体。无包被的运输小泡很快与次级内体融合，由于次级内体中 pH 呈酸性，致使磷酸化的酶与 M6P 受体脱离，接着脱磷酸。通过次级内体的分选作用。溶酶体的酶进入从次级内体出芽形成的运输小泡，接着同溶酶体融合完成溶酶体酶的传递过程。而受体重新回到高尔基体再利用。为简化起见，图中只标出酶蛋白的一个糖基化位点，实际上大多数糖蛋白具有多个糖基化的位点。M6P 受体也位于细胞质膜中，它能够同极少数分泌到细胞外溶酶体酶结合，并形成由网格蛋白包被的运输泡，最后同样被传递给溶酶体。

蛋白但不含 M6P 受体，这种小泡即是成熟溶酶体；另一种小泡只含有 M6P 受体，不含有酶，它们主要是同外侧高尔基体膜融合，偶尔这种小泡也会同质膜融合完成 M6P 的再循环。

另一方面，极少数分泌到细胞外的溶酶体酶与质膜中 M6P 受体蛋白结合，并通过内吞作用被包装到初级内体中，然后通过与来自外侧高尔基体的溶酶体酶运输小泡相同的方式形成成熟的溶酶体。

Brown 和 Farquhar 发现用铵离子（NH_4^+）处理细胞能够干扰溶酶体的分选机制。当溶酶体中胺离子浓度升高时会使溶酶体中的 pH 升高，这样，溶酶体的酶就不能同 M6P 受体脱离，从而影响了 M6P 受体回到高尔基体再循环。其结果，由于高尔基体内侧网络中 M6P 受体的不足，溶酶体的酶就会分泌到细胞外而不是被包装到溶酶体分泌小泡。如果解除 NH_4^+ 的作用，使 M6P 受体得以释放和再循环，溶酶体的分选恢复正常。

值得注意的是，上面所讨论的溶酶体酶分选运输的 M6P 受体途径中运输的都是溶酶体的酶原（proemzyme），经 M6P 受体分选的是没有催化活性的酶原，酶原的活化需要经过一系列

的酶切、构型变化等成熟过程才能形成小分子的具有酶活性的蛋白。成熟过程可能发生在次级内体或者在溶酶体中，这样可避免溶酶体酶在传递过程中对细胞结构造成伤害。

由上可知，溶酶体酶的 M6P 分选途径有几个主要的特点：①M6P 作为分选信号；②包埋在高尔基体中的受体能够被网格蛋白包装成分泌小泡；③出芽形成的溶酶体酶的运输小泡只同酸性的次级内体融合；④通过次级内体的分选作用使受体再循环。

9.4.5.3 M6P 分选途径的发现

M6P 分选途径是通过对一类遗传病的研究发现的。有一类遗传病，称为溶酶体贮积病（lysosomal storage disease），此类遗传病是由于溶酶体中缺少一种或几种酶所致。因此，这种病人不能消化糖脂和一些原本由溶酶体酶消化的细胞外的成分，使这些物质作为大的包含体（inclusion body）积累在溶酶体中。I 细胞病（I-cell disease）是一种特别严重的溶酶体贮积病，这种病人的溶酶体中缺少多种酶。通过比较 I 细胞病人和正常人的溶酶体酶的差异发现 M6P 是溶酶体酶的分选信号，病人细胞中缺少 GlcNAc 磷酸转移酶，不能使溶酶体酶带上甘露糖 6-磷酸标记，缺少 M6P 信号的溶酶体酶不能进入溶酶体，而被分泌到细胞外。

从 I 细胞病人中分离成纤维细胞培养在含有 M6P 溶酶体酶的培养基中，发现细胞中溶酶体的量几乎达到正常人的水平，这一发现说明细胞质膜含有 M6P 受体，并且能够通过内吞作用将培养液中溶酶体的酶转运到细胞内。

9.4.5.4 内体

内体（endosome）也是细胞内一种膜结合的细胞器，有初级内体（early endosome）和次级内体（late endosome）之分，初级内体通常位于细胞质的外侧，次级内体常位于细胞质的内侧，靠近细胞核。内体的主要特征是酸性的、不含溶酶体酶的小囊泡，其内的受体与配体是分开的。一般认为初级内体是由于细胞的内吞作用而形成的含有内吞物质的膜结合的细胞器，通常是管状和小泡状的网络结构集合体。

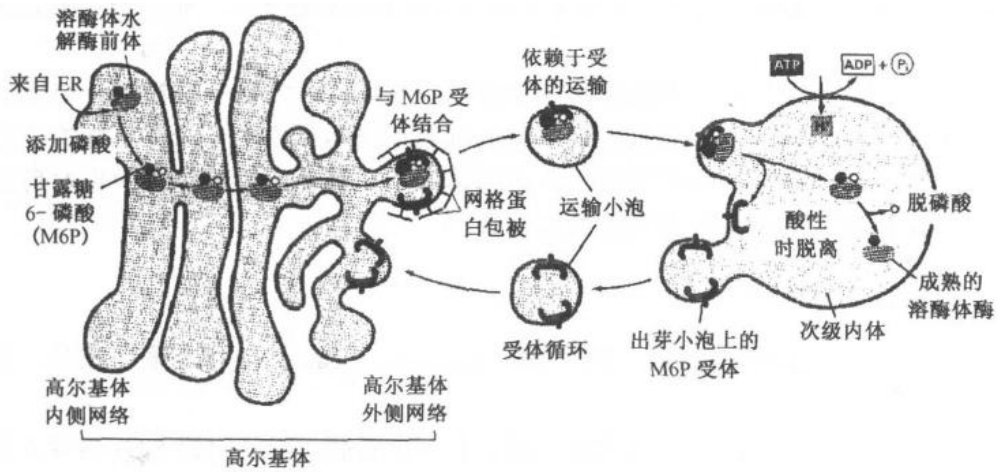


图 9-53 溶酶体酶运输小泡与次级内体的融合及次级内体的分选作用（引自 Alberts *et al.*，1998）

次级内体中的 pH 呈酸性，且具有分拣作用，能够分选结合物的受体，让它们再循环到细胞质膜表面或高尔基体内侧网络，次级内体中的受体和配体不再偶联在一起，所以次级内体又被称为 CURL（compartment of uncoupling of receptor and ligand），意思是受体与配体非偶联的区室。如上面讨论的溶酶体酶运输小泡与次级内体融合后，就是依靠次级内体的分拣作用使受体再循环的。另外，有学者将与溶酶体酶运输小泡融合的次级内体称为前溶酶体，因为此时的次级内体中有溶酶体酶原的存在。内体膜上具有 H^+-ATPase，利用 H^+ 的浓度，保证了内部酸性（图 9-53）。初级内体和次级内体是可以区别的，因为它们的密度、pH 和酶的含量不相同。但是次级内体是如何产生的还不太清楚。

9.4.5.5 溶酶体形成的非 M6P 途径

M6P 途径是溶酶体酶分选的主要途径，但不是惟一的途径，这主要是通过对一种遗传病的研究发现的。黏脂病（mucolipidosis）是一种遗传病，这种病人不能使甘露糖磷酸化。病人的成纤维细胞中含有很多细胞质小泡，小泡中有大量的未被消化的大分子，这些大分子在正常情况下是由溶酶体降解的。由于甘露糖不被磷酸化，意味着大多数溶酶体酶不能正确地进入溶酶体。这样，它们就会通过组成型分泌途径被分泌到细胞外。但是，尽管这种病人的溶酶体酶蛋白中甘露糖不能被磷酸化，仍有一些溶酶体的酶能够被正确地包装到溶酶体中。于是推测，溶酶体的酶除了通过 M6P 途径分选进入溶酶体外，还有非 M6P 依赖性的分选途径，这种推测从 I 细胞病人的肝细胞溶酶体酶分析中得到证实。I 细胞病人的肝细胞中溶酶体的酶也没有 M6P 标记，但是能够正常的进入溶酶体，这就说明这些溶酶体必然是通过非 M6P 依赖的途径进入溶酶体的，但机理尚不清楚。

目前已知的属于非 M6P 途径进入溶酶体的酶还包括溶酶体膜中的糖蛋白以及作为溶酶体膜结合蛋白前体被合成的溶酶体酶（也是糖蛋白）。如酸性磷酸酶在合成时是以前体形式被合成的并且作为 ER 的整合蛋白结合在 ER 的膜中。这种膜结合的前体酶通过高尔基体被运入溶酶体，然后通过切割作为成熟的酸性磷酸酶被释放到溶酶体的腔中。另一个例子就是 β-葡糖脑苷脂酶（β-glucocerebrosidedase），此酶作为前体合成并结合在膜上，但是成熟后仍然结合在溶酶体的膜上。

指导膜结合蛋白从 ER 进入溶酶体的寻靶信号是一段特殊的氨基酸序列，这段序列位于跨膜蛋白的细胞质结构域。如果将酸性磷酸酶的细胞质结构域中的一个酪氨酸突变后，这种酶的前体就只能结合在 ER 的膜而不能进入溶酶体中。在其他的溶酶体酶中也发现类似的情况，说明酪氨酸是溶酶体酶寻靶信号的组成部分。

9.4.5.6 溶酶体与疾病

已知有不少疾病与溶酶体有关，如贮积病（storage disease）、I 细胞病、硅肺、类风湿性关节炎等。

硅肺（silicosis）　职业病，又称磨工病、石末沉着病。空气中的 SiO_2 被吸入肺后，被肺部的吞噬细胞所吞噬，由于吞入的二氧化硅颗粒不能被消化，并在颗粒的表面形成硅酸；硅酸的羧基和溶酶体膜的受体分子形成氢键，使膜破坏，释放出水解酶，导致细胞死亡。释放出的硅粉末再被健康的吞噬细胞吞噬得到同样的结果。如此吞噬细胞相继地吞噬、死亡，

最后导致成纤维细胞产生胶原纤维结节，造成肺组织的弹性降低，肺受到损伤，呼吸功能下降。

II 型糖原贮积病（glycogen storage disease type II）　是最早发现的贮积病。由于常染色体上的一个隐性基因突变，造成了溶酶体缺乏 α-葡萄糖苷酶，缺少了这种酶的溶酶体不能把肝细胞中或肌细胞中过剩的糖原进行水解而大量积累在溶酶体内，造成溶酶体超载。此病多发于婴儿，表现为肌肉无力，心脏增大，心力衰竭，通常于两周内死亡。

休克（shock）　在休克中，由于组织缺血、缺氧，影响了供能系统，导致膜的不稳定，引起溶酶体酶的外漏，造成细胞与机体的损伤。溶酶体的酶外漏的可能机理是：由于缺氧，引起细胞质 pH 值的下降，酸性水解酶活化，水解溶酶体的膜，使膜漏增强，最终导致溶酶体膜破裂，溶酶体酶释放，使细胞组织自溶；而三羧酸循环的受阻则影响细胞氧化磷酸化的过程，ATP 减少，功能不足，钠泵失灵，组织内渗透压下降，导致溶酶体膜的通透性增高，酶释放，组织自溶。因此，在抢救休克病人时，临床上采用大剂量的糖皮质类固醇，以稳定溶酶体的膜。

9.5　细胞的分泌与内吞作用

在溶酶体的形成过程中可以看到，高尔基体内侧网络通过 M6P 受体分选溶酶体酶后要通过出芽形成溶酶体分泌小泡，实际上，从高尔基体内侧网络形成的小泡有很多种，除了溶酶体酶运输小泡外，还有需要运送到细胞外的蛋白质和酶的运输小泡等。将蛋白质运送给细胞质膜或细胞外是通过胞吐作用（exocytosis）完成的，也称细胞的分泌活动。与分泌过程相反的是细胞的内吞作用，如位于细胞质膜中的 M6P 受体蛋白将细胞外溶酶体酶回运到细胞内就是典型的内吞作用。

9.5.1　细胞分泌

动物细胞和植物细胞将在糙面内质网上合成而又非内质网组成部分的蛋白质和脂通过小泡运输的方式经过高尔基体的进一步加工和分选运送到细胞内相应结构、细胞质膜以及细胞外的过程称为细胞分泌（cell secretion）。分泌的物质包括各种酶类、激素、神经递质、局部介质、血清蛋白、抗体以及细胞外基质成分，包括植物的细胞壁成分。分泌活动可以分为两种：一种是分泌的物质供细胞内使用；另一种则要通过与细胞质膜的融合进入细胞质膜或运输到细胞外，就如同人类社会生产的产品，有些是出口换汇的，有些是内销的。如前面讨论的溶酶体及细胞内由高尔基体内侧网络形成的不与细胞质膜融合的各种分泌泡就属于第一种方式。

9.5.1.1　细胞分泌活动的过程

细胞分泌活动是非常重要的生命现象，它不是简单的将内质网合成的物质分发出去，而是通过一套十分严格的机制经过加工、挑选、运输才完成的。整个过程分为 3 个阶段，涉及 3 种不同的细胞器和细胞结构（图 9-54）：内质网、高尔基体、细胞质膜。这 3 部分相当于 3

道关卡，严格地控制着产品的质量。这 3 个部分的职能又是不同的，内质网相当于生产基地，高尔基体相当于产品的精加工和质量检测分配部门，而细胞质膜相当于海关。

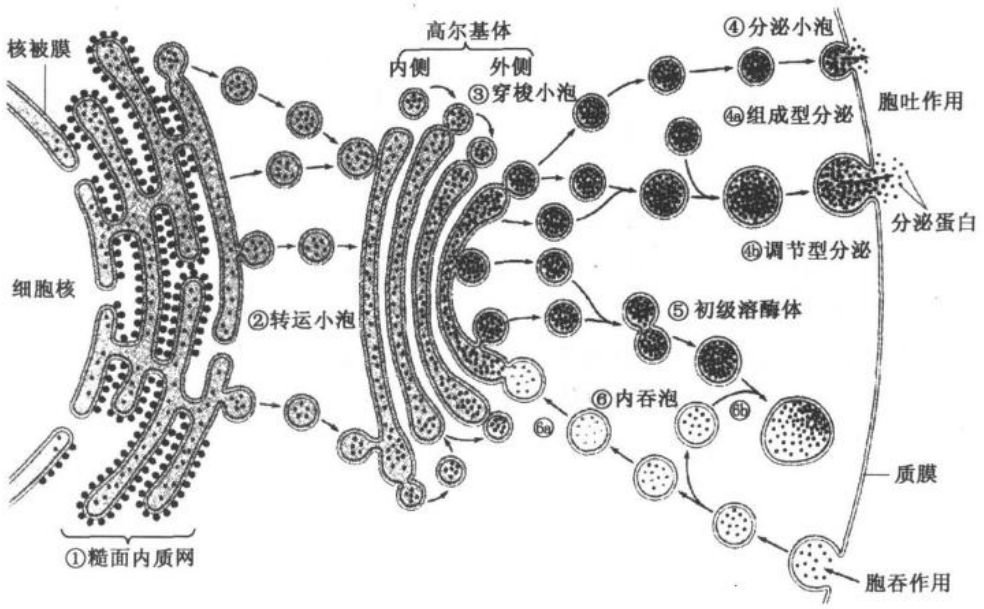


图 9-54　细胞的分泌与内吞作用（引自 Becker *et al*.，1996）

图中显示了由 ER 合成的蛋白质经分泌小泡通过高尔基体运向各目的地，包括溶酶体。①核糖体合成的蛋白质与糙面内质网外表面的结合，并在 ER 腔中糖基化；② 从内质网形成的小泡携带新合成并经糖基化的蛋白质到达内侧高尔基体；③通过膜融合，蛋白质进入高尔基体，并在高尔基体中进一步加工后通过小泡转运到外侧高尔基体，经浓缩并经出芽形成④ 分泌小泡或⑤溶酶体小泡；分泌小泡移向质膜，或通过组成型（4a）或通过调节型（4b）释放小泡内含物；⑥内吞作用从细胞外摄取蛋白质或其他物质，内吞泡或是与外侧高尔基体融合（6a）或是与溶酶体融合（6b）。

9.5.1.2　组成型和调节型的分泌

蛋白质从内质网经高尔基体到细胞表面的物质运输是通过运输小泡和胞吐作用不断进行的。从高尔基体外侧网络形成的分泌小泡运送到细胞质外侧与质膜融合，一方面为细胞质膜提供新的膜蛋白和膜脂，同时把内含物分泌到细胞外，为细胞外基质提供糖蛋白、蛋白聚糖和其他一些蛋白质，包括酶类。这种分泌活动分为两种类型：组成型和调节型（图 9-55）。

组成型分泌途径（constitutive secretory pathway）　这种分泌途径中运输小泡持续不断地从高尔基体运送到细胞质膜，并立即进行膜的融合，将分泌小泡中的蛋白质释放到细胞外，此过程不需要任何信号的触发，它存在于所有类型的细胞中。在大多数细胞中，组成型分泌途径的物质运输不需要分选信号，从内质网经高尔基体到细胞表面的物质运输是自动地进行的。组成型分泌途径除了给细胞外提供酶、生长因子和细胞外基质成分外，也为细胞质膜提供膜整合蛋白和膜脂。

组成型分泌小泡通常称为运输小泡（transport vesicle），是由高尔基体内侧网络对组成型分泌蛋白的包装、出芽形成的。

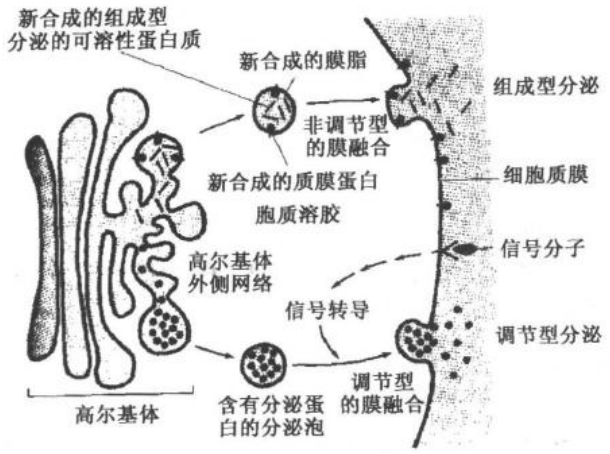


图 9-55　组成型和调节型分泌活动（引自 Alberts *et al*., 1998）

两种分泌途径从外侧高尔基体网络起始，一些可溶性的蛋白质通过组成型分泌途径不断分泌到细胞外通过组成型分泌也为细胞质膜提供了蛋白质和脂的补充。在一些特化的分泌细胞中，除了有组成型分泌，还有调节型的分泌，这种分泌在高尔基体内侧网络形成含有特异蛋白的分泌小泡，小泡到达质膜后需要特殊的信号诱导才能释放到细胞外。

调节型分泌途径（regulated secretory pathway）　又称诱导型分泌，见于某些特化的细胞，如内分泌细胞。在这些细胞中，分泌小泡成群地聚集在质膜下，只有在外部信号的诱导下，质膜产生胞内信号后小泡才与质膜融合，分泌内含物。这种类型分泌小泡形成的方式可能与溶酶体相似，分泌蛋白在高尔基体内侧网络结构中通过分选信号与相应的受体结合，使其分选到分泌泡中。分泌泡比运输溶酶体的运输小泡大，所含的蛋白质远远多于膜受体的量，因此有人认为这种分选可能更像细胞表面受体介导的内吞过程，有网格蛋白参与。

调节型途径中形成的小泡称为分泌泡，不过这种小泡的形成机制与组成型分泌小泡是不同的。在一些特化的分泌细胞中，合成一些特殊的产物，如激素、黏液（mucus）、消化酶，这些产物先被储藏在分泌泡中，这些小泡通过出芽离开高尔基体外侧网络并聚集在细胞质膜附近，当细胞受到细胞外信号刺激时，就会与细胞质膜融合将内含物释放到细胞外。

调节型分泌有两个特点：一是小泡的形成具有选择性；第二个特点是具有浓缩作用，可使被运输的物质浓度提高约 200 倍。

9.5.1.3　极性细胞中的蛋白质分选运输

并非所有细胞的膜蛋白都是组成型分泌的。在有极性的细胞中，如上皮细胞，细胞质膜分成顶端膜和基底外侧膜，两部分细胞质膜含有不同的膜蛋白和膜脂，糖脂和糖蛋白只存在于顶部细胞质膜中。在这种有极性的细胞中，细胞质膜蛋白的分泌活动具有选择性，通过几种不同的分选机制保证所有的质膜蛋白能够到达正确的位置。

极性细胞质膜蛋白分泌定位的一种机制涉及外侧高尔基体对质膜蛋白的分选。研究表明，在外侧高尔基体网络，无论是顶部质膜还是基底侧质膜的蛋白质都是在一起的，但是却被分别包装到两种不同类型的分泌小泡中，一种小泡运向顶部并与顶部质膜融合，而另一种小泡

移到基底侧质膜并与之融合。这些小泡的表面带有不同的引导蛋白与不同部位的靶蛋白结合。

9.5.1.4 分泌活动中高尔基体蛋白的滞留

构成高尔基体的全部蛋白和在高尔基体中起作用的蛋白质都是在糙面内质网上合成并逐步转运到高尔基体。前面讨论过 ER 蛋白的驻留是靠 KDEL 信号，那么高尔基体蛋白是如何被驻留在高尔基体的不同区域呢？定位于高尔基体的各种糖基修饰酶类，如半乳糖基转移酶（galactosyltransferase）和唾液酸转移酶（sialyltransferase）都有一个类似的结构：短的 N 端结构域，该结构域含有催化位点并朝向高尔基体的腔。实验表明，虽然高尔基体膜蛋白的跨膜区不是同源的，但正是通过这种跨膜区使高尔基体膜蛋白驻留在高尔基体中。如将质膜中转铁蛋白受体的跨膜区替换成高尔基体膜蛋白的 α 跨膜区，这种转铁蛋白受体就会驻留在高尔基体膜中。反之，如果用质膜转铁蛋白受体的跨膜结构域取代高尔基体膜中半乳糖基转移酶的跨膜结构域，这种酶就会定位到细胞质膜中。

高尔基体膜蛋白的跨膜结构域是怎样帮助高尔基体膜蛋白定位并防止进一步转运？其机制尚不清楚，只知道高尔基体酶蛋白的跨膜 α 螺旋要比质膜蛋白的跨膜 α 螺旋短 2 或 3 个氨基酸。有一种说法，高尔基体膜蛋白的 α 螺旋的跨膜区能够在脂双层中结合在一起，非常类似光反应中心蛋白质的结合方式，并且能够与细胞骨架中的微丝或微管结合，这样就防止了高尔基体膜蛋白向细胞质膜的转移。

9.5.1.5 分泌过程中的蛋白质加工

在内质网上合成的蛋白质并非合成之后就有活性。某些分泌蛋白（如生长激素）和某些病毒的膜蛋白（如 VSV 糖蛋白）合成后，由蛋白酶从新生肽链上切除 ER 信号序列即转变成成熟的有活性的蛋白质。但是，对于质膜的蛋白质和大多数分泌蛋白来说，开始合成的是相当长的没有活性的前体，称为前蛋白（proprotein），这些蛋白需要进一步加工才能成为成熟的、有活性的蛋白质。如血清白蛋白（serum albumin）、胰岛素、酵母的 α 交配因子以及所有的分泌蛋白和膜蛋白，包括流感病毒的 HA 蛋白。

一般说来，前体蛋白被酶解转变成成熟的分子是在离开高尔基体后的分泌小泡中进行的。正常情况下，成熟的分泌小泡是由几个不成熟的小泡融合而成的，然后通过加工使蛋白质成熟。

某些前蛋白质，包括前白蛋白（proalbumin）在 C 端的某一位点切割一次，产生两个碱性的识别序列，如：Arg-Arg 或者 Lys-Arg（图 9-56a），另外一些前蛋白，在 N 端切除几个氨基酸或在 N 端和 C 端同时切除几个氨基酸。在胰岛素原中，多余的氨基酸称为 C 肽，位于多肽的内部，加工时要将 C 肽切除，并将两端的 A 肽和 B 肽通过二硫键连接起来（图 9-56b）才有功能。

9.5.1.6 胞吐作用与膜的融合

细胞分泌活动的最后一步是胞吐作用，是真核细胞中含有待分泌物的被膜小泡与质膜融合，从而将内含物排出胞外的过程。在组成型分泌活动中，胞吐作用是自发进行的，但是在调节型的细胞中，胞吐作用必须有信号的触发。触发的信号可以是神经递质、激素或 Ca^{2+}

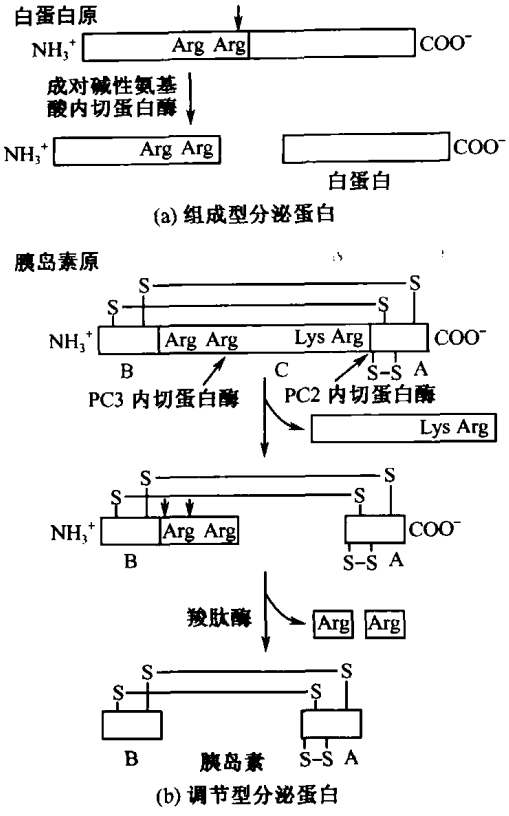


图 9-56　前白蛋白和胰岛素原在组成型和调节型分泌过程中的加工（引自 Lodish *et al*., 1995）

在加工过程中由内切蛋白酶切割 C 端，产生两个连接在一起的碱性氨基酸。(a) 内切蛋白酶——成对碱性氨基酸蛋白酶（furin）切割组成型分泌蛋白的前体；(b) 两个内切蛋白酶 PC2 和 PC3 作用于调节型分泌蛋白的前体。多数此类蛋白的最后一步加工是由羧肽酶（carboxypeptidase）切除多肽链 C 端的两个碱性氨基酸。

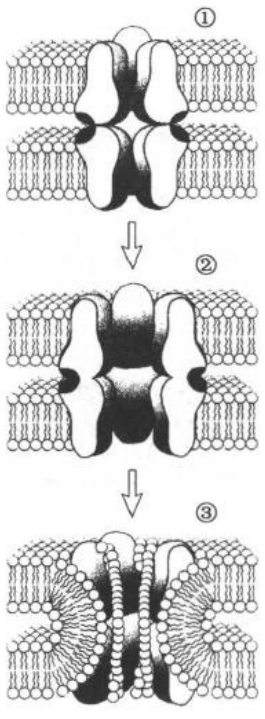


图 9-57　胞吐作用与膜融合模型

①两种膜蛋白相互接触；②两种膜之间形成一个封闭的孔，并逐渐扩大；③由于膜脂的扩散，两种膜的脂双层融合成一体。

等，在胞吐过程中也需要 GTP 和 ATP 等。向分泌细胞注射 Ca^{2+} 可以促进胞吐作用。

胞吐作用的结果一方面将分泌物释放到细胞外，另一方面小泡的膜融入质膜，使质膜得以补充。

胞吐作用的机制尚不清楚，但必须要通过小泡与质膜的融合。在胞吐过程中，分泌泡同细胞质膜的融合只发生在局部细胞质膜上。融合作用是通过融合蛋白（fusion protein）介导的，这些融合蛋白位于膜的表面和膜内，它们的作用是使两种不同的膜靠近、接触、最后融合。两种膜接触导致小的融合孔（fusion pore）的形成（图 9-57），最后两种膜融为一体。

9.5.2　吞噬作用与内吞作用

细胞一方面不断将内部合成的功能分子和代谢废物通过胞吐作用运送到细胞外，又通过内吞作用将细胞外的营养物质等摄取到细胞内，以维持正常的代谢活动。细胞的内吞有两种

类型，一种是吞噬细胞完成的对有害物质的吞噬，另一种是通过细胞质膜受体介导的对细胞外营养物质的内吞。

9.5.2.1 吞噬作用

吞噬作用又称胞吃作用（cellular eating）。吞入物通常是较大的颗粒，如微生物或较大的细胞残片；形成的囊泡叫吞噬体，直径一般大于250nm。吞噬作用只限于几种特殊的细胞类型，如变形虫（amoebae）和一些单细胞的真核生物通过吞噬作用从周围环境中摄取营养。

图 9-58 巨噬细胞正在吞噬衰老的红细胞（引自 Alberts *et al.*，1998）

在大多数高等动物细胞中，吞噬作用是一种保护措施而非摄食的手段。高等动物具有一些特化的吞噬细胞，包括巨噬细胞和中性粒细胞。它们通过吞噬作用摄取和消灭感染的细菌、病毒以及损伤的细胞、衰老的红细胞等（图9-58）。

吞噬作用形成的内吞泡叫吞噬体。吞噬是一种需要信号触发的过程。被吞噬的颗粒必须同吞噬细胞的表面结合，但并不是能结合的颗粒都能够被吞噬。吞噬细胞表面有特化的受体，被激活的受体向细胞内传递吞噬信号。

9.5.2.2 吞饮作用

吞饮作用（pinocytosis）又称胞饮作用（cellular drinking），胞吞作用的一种类型。它是一种非选择性的连续摄取细胞外基质中液滴的内吞过程。吞入的物质通常是液体或溶解物。所形成的小囊泡的直径小于 150nm。吞饮作用通常是从质膜上特殊区域开始的，形成一个小窝，最后形成一个很薄且没有外被包裹的小泡。细胞外基质中存在的任何分子和颗粒都可以通过胞饮作用被细胞吞入。根据细胞外物质是否吸附在细胞表面，将胞饮作用分为两种类型：一种是液相内吞（fluid-phase endocytosis），这是一种非特异性的固有内吞作用，通过这种内吞作用，细胞把细胞外液及其中的可溶物摄入细胞内。另一种是吸附内吞（absorption endocytosis），在这种吞饮作用中，细胞外大分子和（或）小颗粒物质先以某种方式吸附在细胞表面，因此具有一定的特异性。

大多数细胞都能连续地进行吞饮作用。

9.5.2.3 受体介导的内吞作用及内吞泡的命运

受体介导的内吞作用（receptor-mediated endocytosis）是一种特殊类型的内吞作用，主要是用于摄取特殊的生物大分子。大约有 50 种以上的不同蛋白质，包括激素、生长因子、淋巴因子和一些营养物都是通过这种方式进入细胞（表 9-9）。

被吞入的物质首先要同质膜中的受体结合，同受体结合的物质称为配体（ligand），配体即是经受体介导被内吞的特异性大分子。根据配体的性质以及被细胞内吞后的作用分为 4 大

类：①营养物，如转铁蛋白、LDL 等；②有害物质，如病原菌；③免疫物质，如免疫球蛋白、抗原等；④信号物质，如胰岛素等多种肽类激素等。

表 9-9　通过受体介导的内吞作用进入细胞的某些配体

激素
胰岛素（insulin）
黄体生成素（luteinizing hormone，LH）
促卵泡激素（follicle-stimulating hormone，FSH）
生长激素（growth hormone）
催乳素（prolactin）
生长因子
表皮生长因子（epidermal growth factor）
血小板衍生生长因子（platelet-derived growth factor）
转化生长因子（transforming growth factor）
神经生长因子（nerve growth factor）
淋巴因子
白细胞介素（interleukin）
肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor）
干扰素（interferon）
集落刺激因子（colony stimulating factor）
营养物
低密度脂蛋白（low-density lipoprotein，LDL）
转铁蛋白（transferrin）

受体介导的内吞具有选择性，大致分为 4 个基本过程：①配体与膜受体结合形成一个小窝（pit）；②小窝逐渐向内凹陷，然后同质膜脱离形成一个被膜小泡；③被膜小泡的外被很快解聚，形成无被小泡，即初级内体；④初级内体与溶酶体融合，吞噬的物质被溶酶体的酶水解。至于内吞泡的命运则根据受体、配体的不同而不同（图 9-59）。

在受体介导的内吞作用中，吞入到细胞内的物质可分为 3 大类：配体（猎物）、受体和膜组分，它们进入细胞后的命运如何呢？一般而言，配体基本被降解，少数可被利用。大多数受体能够再利用，少数受体被降解。通常受体有 4 种可能的去向：① 受体内吞之后，大多数受体可形成载体小泡重新运回到原来的质膜上再利用，这些受体主要是通过次级内体的分拣作用重新回到细胞质膜上（如 M6P 受体、LDL 受体）。所以次级内体如同高尔基体外侧网络一样，是内吞途径中的主要分选站。次级内体内部酸性环境使受体蛋白改变构型，释放出配体。②受体和配体一起由载体小泡运回到原来的质膜上再利用，如转铁蛋白及转铁蛋白受体就是通过这种方式再循环。③受体和配体一起进入溶酶体被降解，如在某些信号转导中，信号分子与受体一起被溶酶体降解，这是进行信号调节的一种方式。④受体和配体一起通过载体小泡被转运到相对的细胞质膜面，这就是下面要讨论的转胞吞作用（transcytosis）。

9.5.2.4　受体介导的 LDL 的内吞作用

低密度脂蛋白是受体介导内吞作用的一个典型例子。

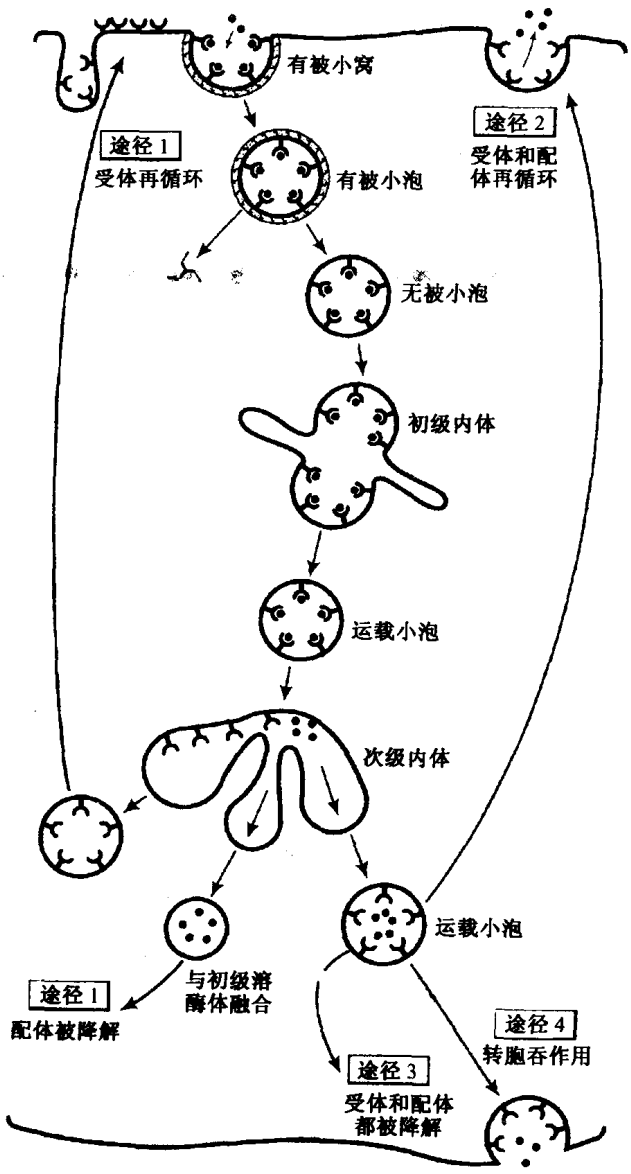


图 9-59　受体介导的内吞泡的命运（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

胆固醇是动物细胞质膜的基本成分，也是固醇类激素的前体。由于胆固醇是疏水性分子，所以它在血液中是以大的脂蛋白的颗粒被运输的。根据脂蛋白的密度分为 4 种类型：极低密度的脂蛋白（very low-density lipoprotein，VLDL）、低密度脂蛋白（low density lipoprotein，LDL）、中等密度脂蛋白（intermediate density lipoprotein，IDL）和高密度脂蛋白（high density lipoprotein，HDL）。

LDL 是一种球形颗粒的脂蛋白（图 9-60），直径为 22nm，核心是 1 500 个胆固醇酯；外面由 800 个磷脂和 500 个未酯化的胆固醇分子包裹；由于外被脂分子的亲水头露在外部，使 LDL 能够溶于血液中。最外面有一个分子质量为 55kDa 的蛋白，叫辅基蛋白 B-100（apolipoprotein B-100，apoB-100），它能够与特定细胞的表面受体结合。

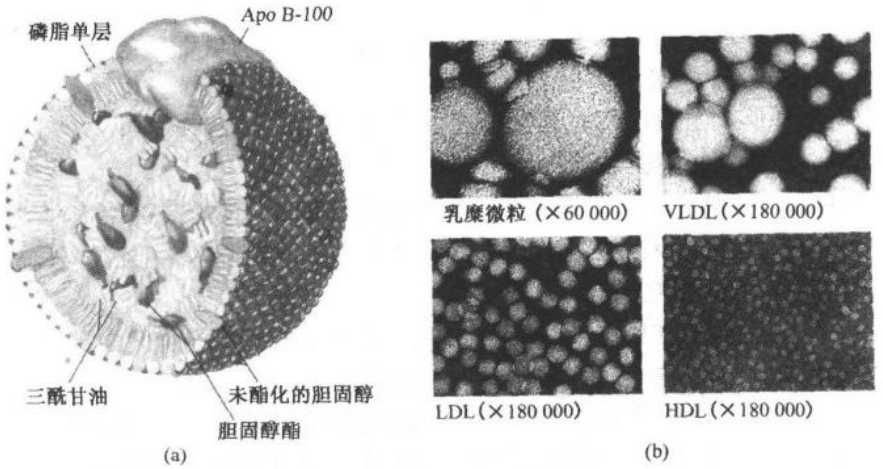


图 9-60　LDL 颗粒结构示意图（引自 Nelson *et al*.，2000）

(a) 由磷脂和未酯化的胆固醇单层构成 LDL 的外膜结构，在外膜上结合一个亲水的 Apo B-100 蛋白，该蛋白可以介导 LDL 与细胞表面的受体结合。(b) 各种密度脂蛋白的电镜照片。

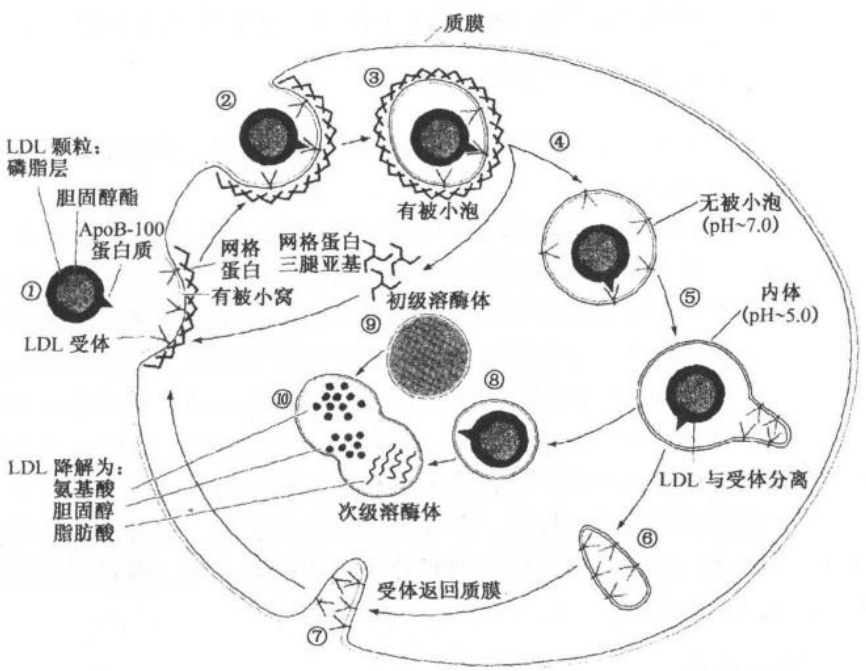


图 9-61　受体介导的 LDL 内吞过程（引自 Voet *et al*.，1995）

①LDL 在质膜的被膜小窝中与受体结合；②小窝向内出芽；③形成被膜小泡；④网格蛋白去聚合形成无被小泡（初级内体）；⑤内体调整 pH 至酸性，使 LDL 与受体脱离（次级内体）；⑥受体被分拣出来，被载体小泡运回到质膜；⑦通过膜融合，受体回到质膜再利用；⑧LDL 被分选进入没有受体的小泡；⑨与初级溶酶体融合形成次级溶酶体；⑩在次级溶酶体中，蛋白质被降解成氨基酸，胆固醇脂被水解产生胆固醇和脂肪酸。

LDL 受体蛋白是一个单链的糖蛋白，由 839 个氨基酸组成，一个很长的 N 端结构域位于细胞外，而位于细胞质面的 C-端较短。跨膜区由 22 个疏水的氨基酸组成，为单次跨膜蛋白。LDL 受体蛋白合成后被运输到细胞质膜，即使没有相应配体的存在，LDL 受体蛋白也会在细胞质膜集中浓缩并形成被膜小窝；当血液中有 LDL 颗粒，颗粒上的 Apo B-100 即与 LDL 受体结合形成 LDL-受体复合物。

一旦 LDL 与受体结合，就会形成被膜小泡被细胞吞入，接着是网格蛋白解聚，受体回到质膜再利用，而 LDL 被传送给溶酶体，在溶酶体中蛋白质被降解，胆固醇被释放出来用于质膜的装配，或进入其他代谢途径（图 9-61）。

LDL 不是血液中惟一的胆固醇运输剂，HDL 也有类似的结构，但含有不同的蛋白质并具有不同的生理作用。LDL 主要是将肝组织的胆固醇运向身体其他部位的细胞；而 HDL 则沿相反方向运输，即从身体其他部位将胆固醇运向肝组织，通过内吞作用被吸收并作为胆汁分泌出去。血液中 LDL 的升高会增加心脏病的危险性，但是血液中 HDL 的水平提高就会降低这种危险性，因为它可以通过肝来降低血液中的 LDL 水平。

血液中 LDL 的水平与动脉粥样硬化（动脉变窄）有极大的关系。动脉阻塞是一个复杂的、尚不十分清楚的过程，其中也包括血管内壁含有 LDL 血斑的沉积。动脉粥样硬斑不仅降低血液流通，也是血凝块形成的部位，它可阻塞血管中血液的流通。在冠状动脉中形成的血凝块会导致心肌梗塞。LDL 受体缺陷是造成血液中 LDL 水平升高的主要原因。

9.5.2.5 转铁蛋白结合铁离子的内吞运输

铁是细胞内的金属离子，对细胞的生命活动具有重要作用，它是通过转铁蛋白和受体介导的内吞作用被输入细胞的。

转铁蛋白（transferrin）受体和配体的内吞途径与 LDL 受体内吞途径不同，在该途径中，受体并不与配体解离，而是一起回到质膜再利用，只是将转铁蛋白结合的铁离子释放出来。

转铁蛋白是血液中一种主要的糖蛋白，负责将肝组织（是铁储藏的主要场所）和肠组织的铁向其他细胞的运输。没有结合铁的转铁蛋白称作脱铁转铁蛋白（apotransferrin），它能够紧紧结合两个 Fe^{3+}，此时称为铁结合转铁蛋白（ferrotransferrin）。所有生长中的细胞表面都有铁结合转铁蛋白的受体，在中性 pH 条件下转铁蛋白与铁结合，然后通过内吞作用进入细胞。在细胞内，在内体的酸性环境下，转铁蛋白释放出铁后仍然同膜受体结合，并与受体一起回到质膜。当细胞外环境变成中性时，转铁蛋白同受体脱离，并自由地结合铁，然后又开始新一轮循环。实际上，转铁蛋白穿梭于细胞外液体和内体之间，避开了溶酶体，快速传递细胞生长所需的铁（图9-62）。

9.5.2.6 转胞吞作用

转胞吞作用（transcytosis）是一种特殊的内吞作用，受体和配体在内吞中并未作任何处理，只是经细胞内转运到相反的方向，然后通过胞吐作用，将内吞物释放到细胞外，这种内吞主要发生在极性细胞中，如抗体转运到血液和奶汁就是这种运输（图 9-63）。

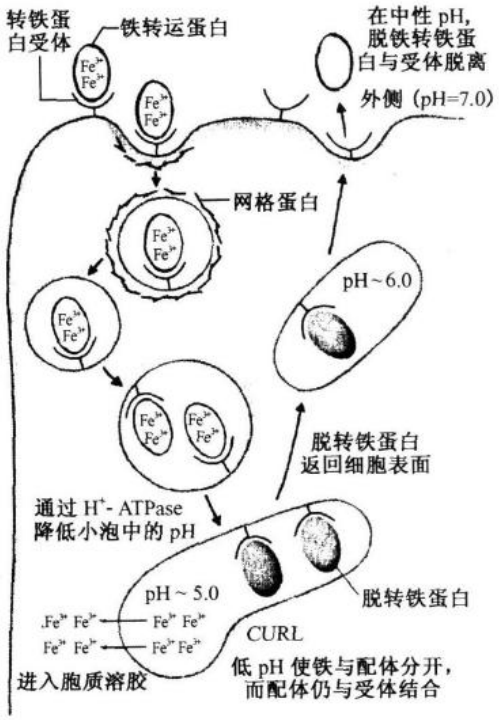


图 9-62　生长细胞中转铁蛋白的循环（引自 Lodish *et al*., 1995）

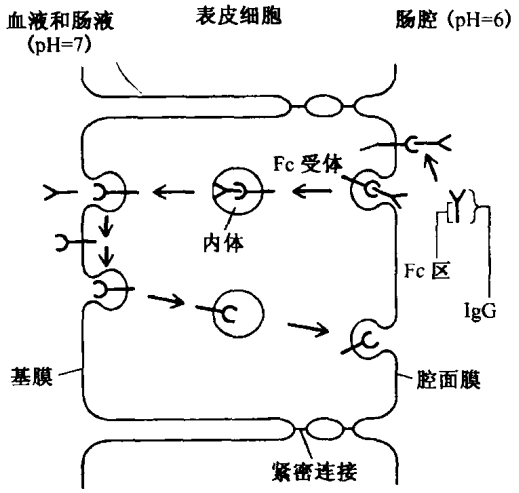


图 9-63　母体 IgG 免疫球蛋白跨过新生鼠表皮细胞的转胞吞作用（引自 Lodish *et al*., 1995）

配体跨细胞的转运同时涉及胞吞作用与胞吐作用。在新生的小鼠中，肠腔内的 pH = 6，而表皮的相对一侧（朝向血管）的 pH = 7，表皮细胞质膜上的 Fc 受体在pH = 6 或更低时与 IgG 的 Fc 结合，在 pH = 7 时不能结合。在腔面形成的含有 Fc 受体-IgG 复合物的内吞体跨细胞移动并与基膜融合，释放出 IgG，卸载的受体通过转胞吞作用回到原来的质膜。

9.6　小泡运输的分子机制

我们已经讨论了内质网上合成的蛋白质的分选是靠新生肽的特殊信号序列以及加工后形成的标记与特定的受体相互作用完成的。但是，蛋白质进入内质网后的运输是通过小泡转运实现的，涉及小泡形成机制问题。另外，在细胞的胞吞作用中，细胞质膜通过向内出芽形成内吞泡，这些内吞泡必须找到正确的靶位点，或是与溶酶体融合、或是与高尔基体融合、或是与另一侧的细胞质膜融合。不仅如此，各种类型的小泡形成后，还要进行一系列的表面变化以及内部 pH 的调整，甚至进行进一步地分选。凡此种种是靠什么来识别和处理呢？这里有 3 个关键问题。

第一，运输小泡形成的机制是什么？为什么某些可溶性的内腔（ER 腔、高尔基体腔）蛋白质和某些膜整合蛋白能够被选择性地包入小泡，而其他的蛋白质却不会？

第二，不同类型的运输小泡具有什么样的分子信号，如何依靠这些信号标记引导小泡同特定靶位点膜结合？例如，来自 ER 的分泌小泡怎样知道移向高尔基体内侧网络并与之融合而

不会移向高尔基体外侧网络？另外，载有溶酶体酶的分泌小泡是如何识别次级内体并与之融合而不与细胞质膜融合呢？

第三，运输小泡的膜同靶细胞结构的膜相互融合的机制是什么？

9.6.1 运输小泡的类型和分选信号

在细胞分泌和内吞过程中，从膜上形成的小泡通常由不同的蛋白质包被，因此称为被膜小泡（coated vesicle）（图 9-64）。

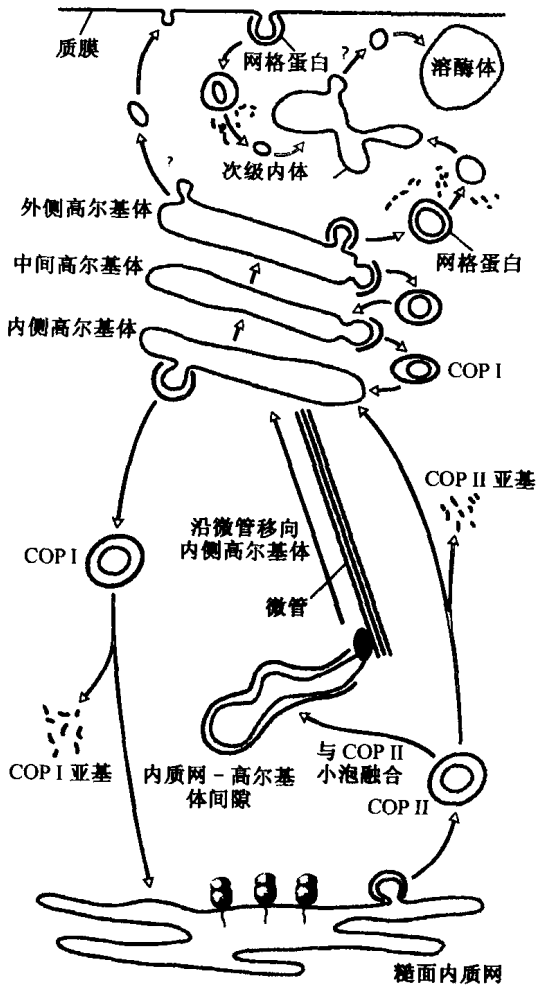


图 9-64 在细胞分泌和内吞途径中三种类型的被膜小泡及运输途径（引自 Lodish *et al*., 1995）

9.6.1.1 分泌小泡的类型

从图 9-64 可见 3 种类型的分泌小泡，第一种是披网格蛋白小泡（clathrin-coated vesicle）。从高尔基体外侧网络出芽形成的选择性的分泌小泡，包括溶酶体酶运输小泡以及细胞质膜中由受体介导的内吞作用形成的内吞泡都是由网格蛋白参与形成的，这些小泡的表面都包裹一层聚合的网格蛋白。披网格蛋白小泡参与外侧高尔基体和质膜之间的选择性分泌和内吞活动，但是从高尔基体外侧网络形成的披网格蛋白小泡与从细胞质膜形成的披网格蛋白小泡所用的衔接蛋白（adaptin，AP）是不同的。

在披网格蛋白小泡形成过程中，网格蛋白同膜受体结合，形成被膜小窝，并使被膜小窝逐渐下陷，最后同膜脱离形成一个包有网格蛋白外被的小泡。据估计，在培养的成纤维细胞中，每分钟大约有 2 500 个披网格蛋白小泡从质膜上脱离下来。

第二种类型是 COPII 被膜小泡（COPII coated vesicle），它介导非选择性运输的一种小泡。这种小泡参与从 ER 到内侧高尔基体、从内侧高尔基体到高尔基体中间膜囊、从中间膜囊到外侧高尔基体的运输。这种小泡的外被是外被蛋白 II（coat protein II，COPII），外被蛋白是一个大的复合体，称为外被体（coatomer）。

第三种类型的小泡是 COPI 被膜小泡，主要介导蛋白质从高尔基体运回内质网，包括从外侧高尔基体运向内侧高尔基体以及将蛋白质从内侧高尔基体运回到内质网。

虽然已经发现了 3 种类型的运输小泡介导不同途径的运输，但还不清楚组成型运输小泡

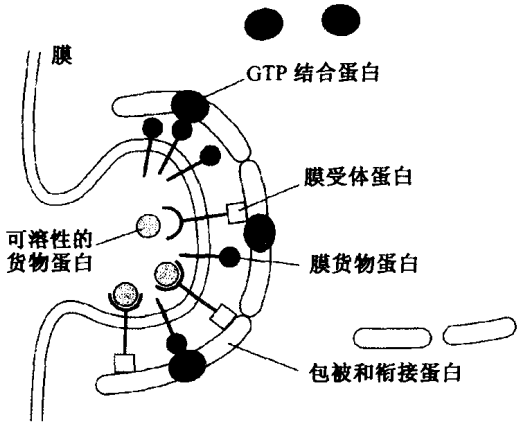


图 9-65　参与被膜小泡出芽形成的一些组分（引自 Lodish *et al*., 1995）
出芽形成被膜小泡时需要小 GTP 结合蛋白、外被体和衔接蛋白、膜受体蛋白等。

是如何包被的。

3 种不同小泡虽然有很多差异，但在小泡形成的方式和所需的成分基本一致（图 9-65）。

3 种类型小泡不仅外被蛋白不同，小泡形成时所需的小 GTP 结合蛋白和衔接蛋白也不相同，见表 9-10 及 9.6.2 节、9.6.3 节部分。

表 9-10　3 种不同类型小泡的外被蛋白、衔接蛋白、小 GTP 结合蛋白及运输路线

小泡类型	外被和衔接蛋白	小 GTP 结合蛋白	运输方向
披网格蛋白小泡	网格蛋白重链和轻链，AP2	ARF	质膜→内体（内吞作用）
	网格蛋白重链和轻链，AP1	ARF	高尔基体→内体
	网格蛋白重链和轻链，AP3	ARF	高尔基体→溶酶体、液泡、黑色体、血小板小泡
COPI 被膜小泡	COP α，β，β′，γ，δ，ε，ζ	ARF	高尔基体内侧→ER 高尔基体膜囊间的回运
COPII 被膜小泡	Sec23/Sec24 复合物 Sec13/Sec31 复合物，Sec16	Sar1	ER→高尔基体

9.6.1.2　小泡运输的分选信号

3 种不同类型运输小泡的形成和定向运输都是由信号指导的。如 KDEL 信号是内质网蛋白的滞留信号，因此 KDEL 是 COPI 被膜小泡形成的信号。小泡的形成不仅需要信号，同时也需要衔接蛋白和信号受体，表 9-11 综合了 3 种类型运输小泡的一些信号、受体和衔接分子。

表 9-11　分泌蛋白与膜蛋白经小泡运输的分选信号

信号序列 *	蛋白质的类型	运输方向	小泡类型	信号受体
Lys-Asp-Glu-Leu（KDEL）	分泌蛋白	高尔基体→ER	COPI 被膜小泡	位于高尔基体的 KDEL 受体（ERD2 蛋白）
Lys-Lys-X-X（KKXX）	膜蛋白	高尔基体→ER	COPI 被膜小泡	COPα 和 β 亚基
二酸性（如 Asp-X-Glu）	膜蛋白	ER→高尔基体	COPII 被膜小泡	未知
M6P	分泌蛋白	外侧高尔基体和质膜向次级内体	披网格蛋白小泡	外侧高尔基体和质膜中 M6P 受体，AP1 和 AP2 衔接蛋白
Tyr-X-X-Φ（YXXΦ）	膜蛋白	质膜→内体	披网格蛋白小泡	AP2 衔接蛋白
Leu-Leu（LL）	膜蛋白	质膜→内体	披网格蛋白小泡	AP2 衔接蛋白

* X＝任何氨基酸，Φ＝各种疏水氨基酸；括号中单字母表示氨基酸的单字母缩写，而非括号中的单字母不仅表示氨基酸缩写，也表示是膜蛋白的细胞质结构域。

9.6.2　披网格蛋白小泡形成的机制

在大量进行内吞活动的细胞（如肝细胞、成纤维细胞）中，细胞质膜有许多网格蛋白小窝（图 9-66）。这些小窝的形成需要很多接合器（adapter）和网格蛋白，小泡最后与质膜的脱离还需要一种称作发动蛋白（dynamin）的 GTP 结合蛋白。

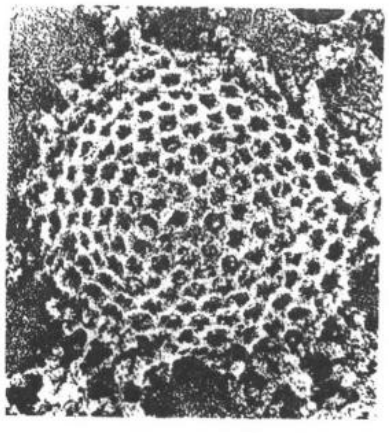


图 9-66　成纤维细胞质面的网格蛋白被膜小窝的电子显微镜照片（引自 Lodish *et al*., 1995）

9.6.2.1　网格蛋白及包被亚基

典型的披网格蛋白小泡的直径为 50～100nm。网格蛋白（clathrin）是一种进化上高度保守的蛋白质，由分子质量为 180kDa 的重链和分子质量为 35～40kDa 的轻链组成二聚体，3 个二聚体形成包被的基本结构单位——三脚蛋白体（triskelion），或称三脚蛋白复合体。有两种类型的轻链：α 链和 β 链，二者的氨基酸有 60% 是相同的，但还不知道它们在功能上有什么差别。许多三脚蛋白复合体再组装成五边形或六边形网格结构，即包被亚基（coat subunit），然后由这些网格蛋白亚基组装成披网格蛋白小泡（图 9-67）。

9.6.2.2　衔接蛋白和发动蛋白

在网格蛋白被膜小窝形成时，网格蛋白和膜之间有一种蛋白质起衔接作用，这就是衔接

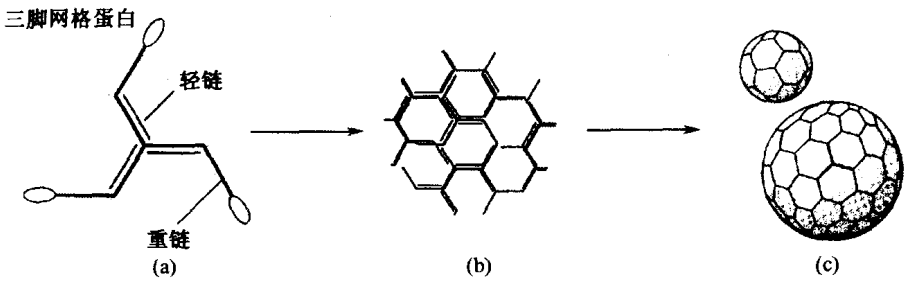


图 9-67　网格蛋白的结构

(a) 网格蛋白的三脚复合物；(b) 网格蛋白包被亚基；(c) 披网格蛋白小泡。

蛋白。所以衔接蛋白是一种在披网格蛋白小泡形成中起中介作用的蛋白质（图 9-68）。

很早就知道细胞质膜中被包装到网格蛋白小窝的受体蛋白的细胞质结构域具有 Tyr-X-X-Φ 序列或 Leu-Leu 序列（表 9-11），这种信号序列在小泡装配时能够与 AP2 相互作用，质膜上没有该信号序列的蛋白质不能同 AP2 作用因而不能被包装到披网格蛋白小泡中。与 AP2 不同的是，衔接蛋白 AP1 参与外侧高尔基体的披网格蛋白小泡的出芽。由于 M6P 受体蛋白既存在于外侧高尔基体又存在于细胞质膜，所以这种受体既能同 AP1 作用又能与 AP2 相互作用。衔接蛋白 AP2 是一个二聚体，并且是由 α 衔接蛋白（α 链）和 β 衔接蛋白（β 链）两种衔接蛋白组成的异二聚体。

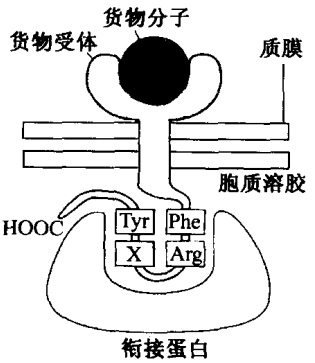


图 9-68　衔接蛋白与膜受体细胞质结构域中的信号序列相互作用(引自 Alberts *et al*., 1994)

后来在酵母和鼠的研究中又鉴定了一种衔接蛋白——AP3，具有 AP3 突变的酵母，外侧高尔基体的某些蛋白就不能被运输到液泡、溶酶体。

在披网格蛋白小泡形成过程中还需要发动蛋白的参与。发动蛋白是一种胞质溶胶蛋白，有 900 个氨基酸残基，能够同 GTP 结合并将 GTP 水解。发动蛋白的作用是在被膜小窝的颈部聚合，通过水解 GTP 调节自己收缩，最后将小泡与质膜割开。发动蛋白是一种 G 蛋白，也是披网格蛋白小泡形成的装配反应因子（assembly reaction factor，ARF）。

9.6.2.3　披网格蛋白小泡的形成和运输机制

披网格蛋白小泡的形成分为 3 个过程。

先形成网格蛋白被膜小窝（clathrin-coated pit），它是披网格蛋白小泡形成过程中的一个中间体。在胞吞过程中，吞入物（配体）先同膜表面特异受体结合，然后网格蛋白装配的亚基结合上去，使膜凹陷成小窝状。由于这种小窝膜外侧结合有许多网格蛋白，故称为网格蛋白被膜小窝。它大约在 1min 之内就会转变成被膜小泡。

第二个过程是披网格蛋白小泡的形成。在形成了网格蛋白被膜小窝之后，很快通过出芽的方式形成小泡，即披网格蛋白小泡，小泡须在发动蛋白的作用下与质膜割离。由于此时的小泡外面有网格蛋白包被，故称为有被小泡。

第三步是披网格蛋白小泡形成之后，很快脱去网格蛋白的外被，成为无被小泡。披网格蛋白小泡在正常的胞质溶胶 pH 和离子强度条件下是相当稳定的，但通常所观察到的是披网格蛋白小泡装配成功之后很快去聚合脱去包被网格蛋白。研究发现，在真核细胞中有一种分子伴侣 Hsc70 催化披网格蛋白小泡的外被去聚合形成三脚蛋白体，并重新用于披网格蛋白小泡的装配。披网格蛋白小泡通过网格蛋白的去聚合就变成了无被小泡。另外 Ca^{2+} 也参与了包被的形成和去被的过程。在形成包被时，钙泵将 Ca^{2+} 泵出细胞外，使胞质中的 Ca^{2+} 保持低浓度，有利于有被小窝的形成。一旦形成被膜小泡，Ca^{2+} 同网格蛋白的轻链结合，使包被不稳定而脱去。披网格蛋白小泡形成的过程示于图 9-69。

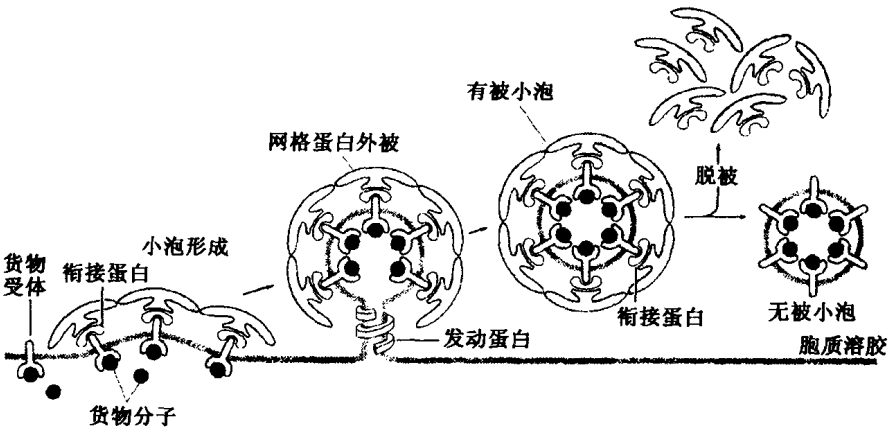


图 9-69　披网格蛋白小泡的形成过程（引自 Alberts *et al*., 1998）

9.6.3　COP 被膜小泡形成的机制

COP 被膜小泡介导的是非选择性的小泡运输，包括从内质网到高尔基体潴泡、从一个潴泡到另一个潴泡、到高尔基体外侧网络以及从外侧高尔基体向 ER 的回运。

9.6.3.1　小 GTP 结合蛋白

细胞中有两类结构不同的 GTP 结合蛋白：一种是单体 GTP 结合蛋白（也称单体 GTPase），含有一条多肽链，即是小 GTP 结合蛋白；另一种是三体 GTP 结合蛋白，（也称 G 蛋白），含有 3 个不同的亚基。虽然认为这两类 GTP 结合蛋白在小泡运输中都有作用，但对单体 GTPase 的作用了解得较多。

小 GTP 结合蛋白是细胞内的一个大的蛋白家族，它以两种状态存在：同 GTP 结合时，具活性状态；同 GDP 结合，则是非活性状态。小 GTP 结合蛋白的活性和非活性状态的转变取决于两种蛋白：一种是鸟嘌呤核苷释放蛋白（guanine-nucleotide-releasing protein，GNRP），它催化 GDP 同 GTP 的交换。另一种是 GTP 酶激活蛋白（GTPase-activating protein，GAP），它触发结合的 GTP 水解。

许多小 GTP 结合蛋白都有一个共价结合的脂基团，帮助它们同膜结合。

9.6.3.2 装配反应因子及 COPI 被膜小泡的形成

装配反应因子（assembly reaction factor，ARF）被认为是外被体蛋白外被的装配和去装配的信号。装配反应因子是一种单体 GTPase，由一条多肽链组成，同时含有一个脂肪酸的尾部，属单体 GTP 结合蛋白（monomeric GTP-binding protein）。

ARF 在 COP 被膜小泡形成的过程中起重要作用。当 ARF 同 GDP 结合时，没有活性，其脂肪酸的尾部隐藏在蛋白质的空间结构中，ARF 也就不能同膜结合。当无活性的 ARF-GDP 同供体膜上的鸟嘌呤核苷释放蛋白结合时，引起 ARF 释放 GDP，并同 GTP 结合，GTP 使

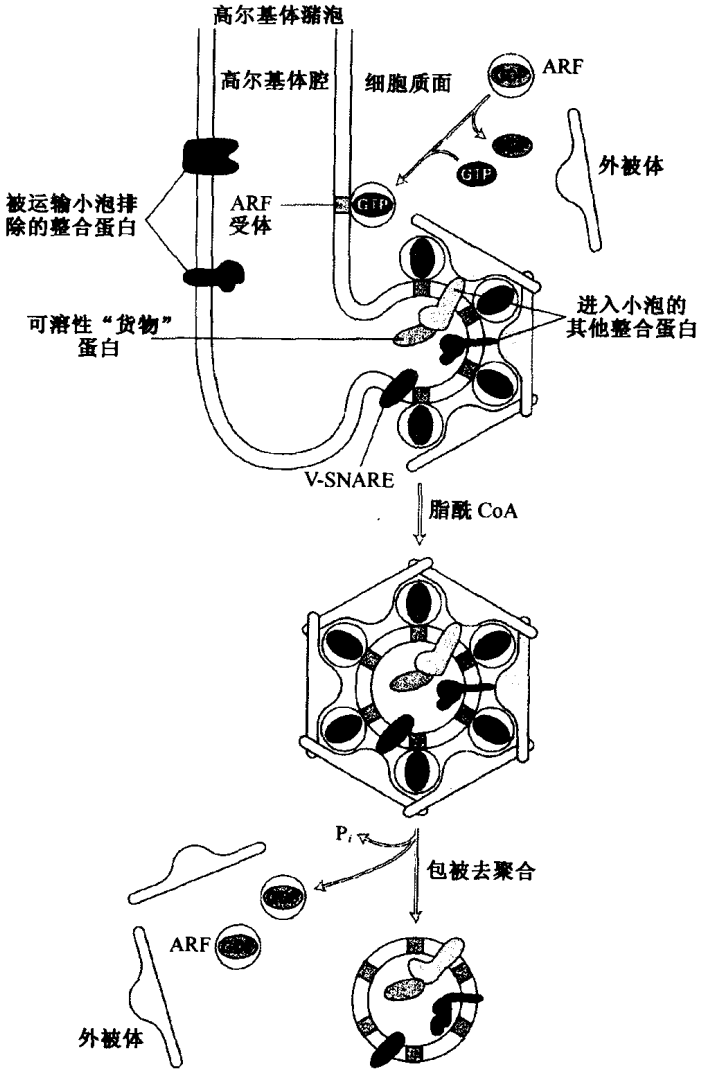


图 9-70 COPI 被膜小泡形成的过程

在高尔基体膜中一种酶的催化下，ARF 蛋白将所结合的 GDP 与 GTP 进行交换，出芽随即开始。ARF-GTP 与高尔基体膜中 ARF 受体结合后，外被体与高尔基体的胞质溶胶面结合并聚合成纤维状外被体，诱导出芽形成小泡。在出芽形成小泡过程中，不仅将被运输的物质包进小泡，也包括其他一些膜蛋白，其中包括 V-SNARE，它的作用是导航，指引小泡到达正确的目的地。脂酰 CoA 帮助小泡与供体膜脱离，随着 GTP 的水解小泡的外被解聚。

ARF 的构型发生改变，暴露出它的脂肪酸链，并随即插入到供体膜中。同膜结合后的 ARF-GTP 可以同外被体结合，形成被膜小泡。抗生素 brefeldrin A 可以抑制 GDP 同 GTP 的交换，这就是引起高尔基体蛋白回流到 ER 的原因。

COPI，是一种胞质溶胶蛋白，由 7 个亚基组成：α、β、β′、γ、δ、ε、ζ。如同网格蛋白，COPI 在出芽小泡的胞质溶胶面聚合，形成外被体被膜小泡，COPI 的某些亚基（如 β 亚基）具有衔接蛋白的作用，可同膜蛋白的细胞质结构域结合促进小泡的形成，由 COPI 作为外被的小泡称为 COPI 被膜小泡。

通过无细胞系统研究了 COPI 运输小泡的出芽过程（图 9-70）：① 一种胞质溶胶中的小分子 GTP 结合蛋白，即 ARF，释放所结合的 GDP，然后同 GTP 结合，形成 ARF-GTP 复合物，并整合在高尔基体膜中。GDP 与 GTP 的交换是由高尔基体膜中的一种酶催化的，但这种酶的活性是如何调节的还不清楚。② COPI 同 ARF 以及高尔基体膜蛋白的细胞质部分结合。③在脂酰 CoA（fatty-acyl CoA）的帮助下形成 COPI 被膜小泡，但脂酰 CoA 的确切作用尚不清楚。一旦 COPI 小泡形成就立即从供体膜释放出来，COPI 包被去聚合，并与膜脱离，这一过程是由与 ARF 结合的 GTP 水解所触发。

前面讨论过内质网滞留蛋白都有 KDEL 信号，如果错误输出到高尔基体，则由位于高尔基体膜囊中的 KDEL 受体识别并与之结合。这种受体又是如何被 COPI 识别并包装进入COPI 小泡？研究发现，KDEL 受体的细胞质面有 Lys-Lys-X-X 序列作为 COPI 的识别信号。同样，其他要回运到 ER 的蛋白的细胞质面都有这种信号。由此推测，COPI 被膜小泡介导的运输方向是从高尔基体到内质网的回流。

9.6.3.3 COPII 小泡的形成

COPII 小泡介导从 ER 到高尔基体的运输，所以小泡首先是从 ER 形成的，其外被蛋白与 COPI 相似但不相同，故称为 COPII 外被膜。COPII 也是多亚基的蛋白复合物，构成的亚基有 Sec23/Sec24 复合物、Sec13/Sec31 复合物、Sec16 等。

COPII 小泡的装配也需要一种称为 Sar1 的 G 蛋白的参与。当 Sar1 中 GDP 与 GTP 进行了交换，诱导 Sec23 和 Sec24 蛋白的结合，接着是 Sec13 和 Sec31 蛋白的结合，最后由一种结合在 ER 表面的大蛋白质，Sec16 与 Sec23/Sec24 复合物、Sec13/Sec31 复合物相互作用，装配成一个完整的小泡。

在 COPII 的小泡膜上有一个分子质量为 24kDa 的蛋白质帮助选择被运输的可溶性的 ER 蛋白。COPII 小泡装配时的识别信号是双酸性分选信号（di-acidic sorting signal），如 Asp-X-Glu。这种信号序列与 COPII 的一个或多个亚基结合。另外，从 ER 形成的 COPII 小泡常常相互融合成大的运输泡，这种大的运输泡需要以微管作为运输轨道向高尔基体运输。

9.6.4 小泡的定向运输、停靠和融合机制

无论是选择性还是非选择性的运输小泡，它们都必须高度选择性地有方向地到达目的地，这提示：所有的转运小泡在它们的膜表面都有一些标志，指示它们沿着一定的方向前进，并到达正确的地点。那么定向运输和停泊的标志是什么呢？到达目的地后如何停泊？各种小泡

都是膜封闭的结构，它们又是怎样突破膜结构的障碍释放出内含物？

9.6.4.1 运输小泡寻靶：SNARE 假说

在胞吐过程中，分泌小泡从高尔基体外侧网络形成之后必须找到正确的靶位点并与之融合。小泡如何发现它的目的地？细胞中通过胞吞和胞吐作用进进出出的运输小泡很多，可以说是车水马龙、熙熙攘攘、热闹非凡；在这种十分繁杂的情况下，各种小泡能够准确地到达目的地，是难以理解的。Rothman 和他的同事提出了一个 SNARE 假说（SNARE hypothesis）。他们发现动物细胞融合需要一种可溶性的细胞质蛋白，叫做 *N*-乙基马来酰亚胺敏感融合蛋白（*N*-ethylmaleimide-sensitive fusion protein，NSF）以及其他几种可溶性 NSF 附着蛋白（soluble NSF attachment protein，SNAP）。NSF 是一种四聚体，4 个亚基都相同。SNAP 有 α-、β-和 γ- SNAP 等几种不同的形式，NSF/ SNAP 能够介导不同类型小泡的融合，说明它没有特异性。Rothman 提出一种假设：膜融合的特异性是由另外的膜蛋白提供的，把这种蛋白称为 SNAP 受体（SNAP receptor）蛋白，或称为 SNARE，这种蛋白可以作为膜融合时 SNAP 的附着点。按照这种模型，每一种运输小泡都有一个特殊的 V-SNARE（vesicle-SNAP receptor）标志，能够同适当的靶膜上的 T-SNARE（target-SNAP receptor）标志相互作用。一种运输小泡在没有找到合适的靶位点之前有可能同几种不同的膜位点进行过暂时性地接触，这种接触是不稳定的，只有找到真正的靶位点才会形成稳定的结构（图 9-71）。

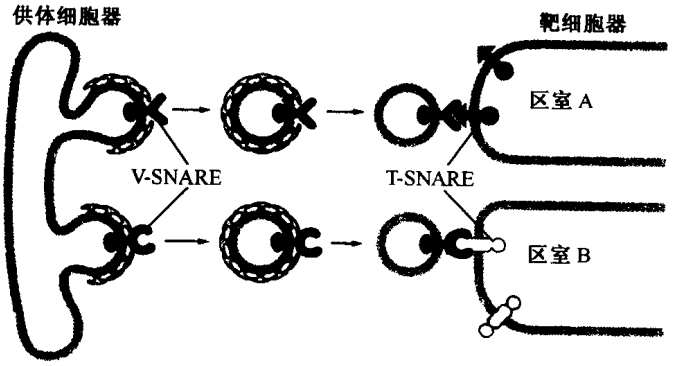


图 9-71 运输小泡寻靶（引自 Alberts *et al*., 1994）
不同的小泡上具有不同的 V-SNARE，它能识别不同靶膜上的 T-SNARE 并与之结合，以此保证运输小泡到达正确的目的地。

存在于小泡膜上的 V-SNARE 是在外被体外被形成时共包装到转运小泡上的，它同靶位点膜上的 T-SNARE 蛋白的结合决定了转运小泡的选择性地停靠。

9.6.4.2 Rab 蛋白在小泡运输与融合中的调节作用

Rab 蛋白是一类调节型的单体 GTPase，属小 GTP 结合蛋白（small GTP binding protein）。所有的 Rab 蛋白都是由大约 200 个氨基酸组成的，并且有类似于 Ras 蛋白的重叠结构。它能够结合 GTP 并将 GTP 水解，因此认为 Rab 蛋白通过 GTP-GDP 的循环来调节小泡的融合（图 9-72）。

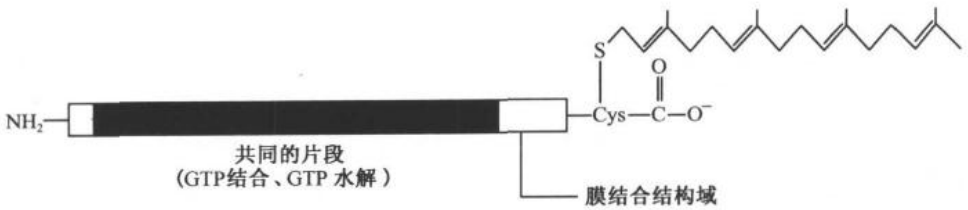


图 9-72　Rab 蛋白的结构

Rab 蛋白在小泡的转运和融合中的调节机制可能是：供体膜上的鸟嘌呤核苷释放蛋白（GNRP）识别胞质溶胶中特异的 Rab 蛋白，诱导 GDP 的释放并和 GTP 结合，进而改变 Rab 蛋白的构型，改变了构型的 Rab 蛋白暴露出其脂基团，从而将 Rab 蛋白锚定到膜上。运输小泡形成后，在 V-SNARE 的引导下，到达受体膜的 T-SNARE 部位，Rab 帮助小泡与受体膜结合。Rab 蛋白上的 GTP 水解后从膜中释放出来，而小泡却锁定在受体膜上，释放出的 Rab 进入胞质溶胶进行再利用（图 9-73）。

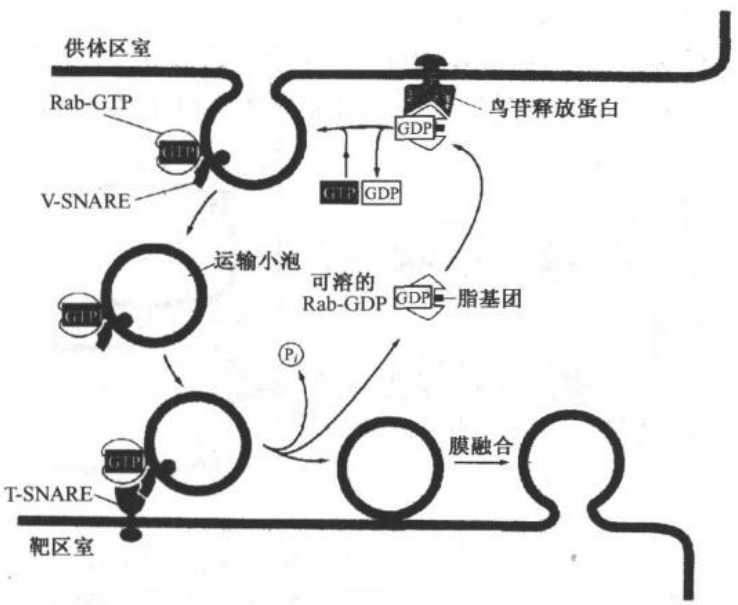


图 9-73　Rab 蛋白在小泡运输和融合中的调节作用（引自 Alberts *et al*., 1994）

9.6.4.3　小泡融合模型

根据 SNARE 假说以及对 Rab 蛋白等生化和遗传学研究结果表明，小泡融合时，需要 V-SNARE、T-SNARE 和融合蛋白 SNAP25 的存在。将含有纯化的 V-SNARE 的人工脂质体与含有 T-SNARE/SNAP25 复合物的脂质体一起温育，渐渐地两种膜融合到一起，V-SNARE、T-SNARE/SNAP25 出现在同一种膜上。在细胞中融合只要几秒钟，但需要几种胞质溶胶蛋白的参与，包括 NSF、α-、β-和 γ-SNAP，它们的作用可能是使 V-SNARE、T-SNARE/SNAP25 解离以便于再利用，同时扩大融合。图 9-74 是根据体外实验的结果提出的小泡融合

模型。

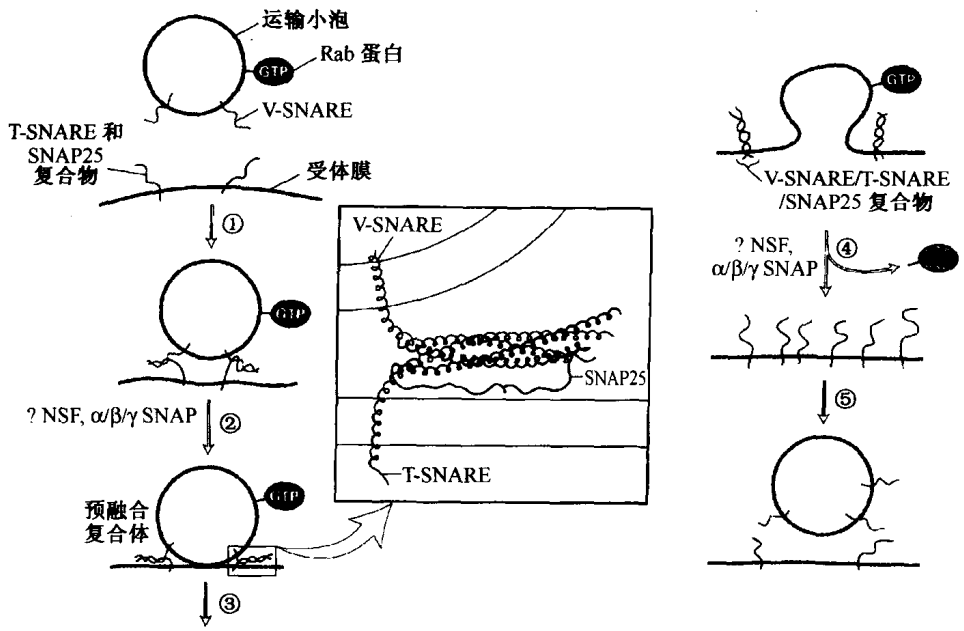


图 9-74　运输小泡寻靶与融合模型（引自 Lodish *et al*., 1999）

①运输小泡通过小泡膜中的 V-SNARE 与靶膜 T-SNARE/SNAP25 复合物的细胞质结构域相互作用，形成螺旋结构，使运输小泡附着到受体膜。小泡膜中的 Rab 蛋白作为小泡寻靶和融合的定时器。②通过多个 V-SNARE 与靶膜 T-SNARE 相互作用以及 ATP 的水解形成预融合复合物。③ 预融合开始之后立即进行融合，但详细机制不清。④在融合过程中，相互作用的蛋白进行解离，如 T-SNARE/V-SNARE/SNAP25 相互分开，促进了进一步的融合。⑤ 含有 V-SNARE 小泡的形成并回到原始膜中。

9.6.5　膜的生物发生

细胞质膜以及内膜系统的膜是怎样合成的，曾提出两个模型，一个是自装配模型（spontaneous self-assembly），是指膜利用已有的材料装配合成。为了验证这一模型，用纯化的脂和蛋白质在体外装配时总是形成脂质体，这种脂质体与活细胞膜的一个根本区别是：脂质体总是对称的，而活细胞中膜结构则是不对称的。第二个模型是膜的合成通过不断地将脂和蛋白插入已有的膜，即由已有膜的生长而来。由于是将脂或蛋白质插入已有的膜上，插入的方式就可以有选择地在膜的一侧或另一侧插入，从而保证了膜结构的不对称性。由于细胞的胞吞和胞吐作用以及小泡运输，使膜处于动态平衡状态，这样膜也就不必重新合成，而是在原有的基础上不断更新。

9.6.5.1　膜脂的来源及不对称性分布

大多数磷脂是在 ER 上合成的，可通过两种途径运送给膜结合细胞器。第一种途径是通过磷脂转运蛋白，如线粒体、叶绿体、过氧化物酶体等细胞器膜中的脂就是靠这种方式运送的。第二种方式是通过出芽和膜融合，如 ER 通过出芽形成分泌小泡运送蛋白质时，膜脂也

随之运送到高尔基体，并通过高尔基体形成分泌小泡将膜脂运送到细胞质膜。由于内质网与核膜相连，通过细胞分裂和核膜重建，ER 上合成的膜脂也就转移到核膜。原核生物没有内质网，它的磷脂是在质膜上合成并由类似于真核生物的转位蛋白调整磷脂在膜上的分布。

如何保持磷脂在膜上的不对称性分布，有几种解释：一种是磷脂交换蛋白对磷脂的运输和插入是选择性的；第二种解释是热动力驱使磷脂的不对称分布，因为膜两侧的环境不同。另外在 ER 膜中有翻转酶，在新的磷脂合成之后，通过翻转酶的作用也会造成磷脂的不对称分布。

9.6.5.2 膜整合蛋白和外周蛋白的形成

就蛋白质在膜上的存在方式来说有 3 种可能，即整合蛋白、外周蛋白和脂锚定蛋白。细胞内蛋白质是在膜旁核糖体或游离核糖体上合成的，合成的蛋白质通过信号序列被定位到不

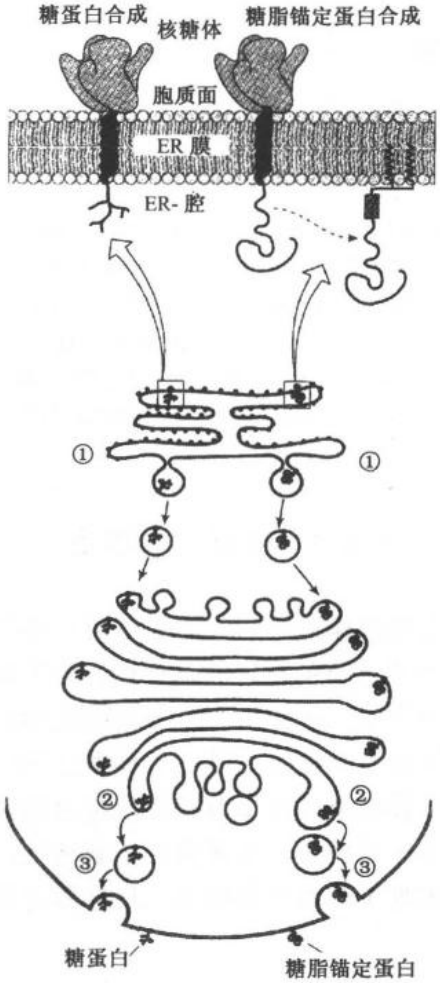


图 9-75 膜整合糖蛋白和膜糖脂锚定蛋白在质膜中定向机制(引自 Kleinsmith *et al*.,1995)
新合成的膜整合糖蛋白插入质膜的过程分 3 个阶段：①通过出芽从 ER 上形成含有新合成的跨膜糖蛋白的膜运输小泡，并同高尔基体融合；②从高尔基体复合物形成含有膜糖蛋白的小泡融入并运到细胞表面；③小泡与质膜融合，糖蛋白暴露于细胞外。糖脂锚定蛋白插入到细胞质膜的过程与膜整合糖蛋白的过程相似，也要经过 3 个阶段。

同的膜结合细胞器上。问题是，整合蛋白具有方向性，外周蛋白有膜内外两侧的分布问题，它们是如何形成的？

用水泡性口炎病毒（vesicular stomatitis virus，VSV）作为模式系统研究了细胞膜整合蛋白和外周蛋白的形成途径。VSV 病毒有两种膜蛋白，一种是 M 蛋白，属外周蛋白，另一种是 VSV 糖蛋白，属膜整合蛋白。用放射性的氨基酸标记蛋白质，然后研究新合成蛋白质的去向，发现：M 蛋白是在游离核糖体上合成，并以可溶的形式释放到胞质溶胶中。然后再与细胞质膜的胞质溶胶面结合，成为外周蛋白。根据这一发现推测膜内侧的外周蛋白可能都是以这种方式合成并与质膜结合。与 M 蛋白不同的是，VSV 糖蛋白在 ER 上合成并插入到 ER 的膜中，随小泡转运经高尔基体加工，最后转运到质膜。

膜整合蛋白的运输是通过组成型分泌方式运送到细胞质膜的，由于膜整合蛋白没有溶酶体酶蛋白的特殊信号，所以在加工运输过程中不会被包装到溶酶体或其他调节型的分泌小泡中。另外膜整合蛋白中的糖蛋白中的糖是在 ER 腔中添加上的，所以在整个小泡运输过程中，糖基都位于腔面，但与质膜融合时，通过外翻，糖的部分位于细胞质膜的外侧（图 9-75）。这就是为何几乎所有质膜上的糖蛋白的糖都是朝向细胞外的原因。

9.6.5.3 脂锚定蛋白的形成

蛋白通过与膜脂的结合成为脂锚定蛋白，有两种可能的机制。

（1）**糖脂锚定的膜蛋白**　细胞质膜外的一些蛋白是与糖基磷脂酰肌醇（GPI）共价结合的，属于这种类型的脂锚定蛋白是在糙面内质网上合成，然后在 ER 腔中被连接到 ER 膜的 GPI 上，随后通过小泡运输，经高尔基体出芽形成小泡，最后与质膜融合，含糖的一面外翻朝向细胞外侧（图 9-75）。

（2）**脂肪酸锚定膜蛋白的形成**　此类膜蛋白通过与脂肪酸链的共价结合被锚定在质膜的细胞质面。连接的脂肪酸包括豆蔻酸（myristic acid，一种十四碳的饱和脂肪酸）和棕榈酸（palmitic acid，一种十六碳的饱和脂肪酸）。此类蛋白是水溶性的，在游离核糖体合成后释放到胞质溶胶中，然后才与质膜中的脂肪酸共价结合。

提　要

内膜系统主要是指内质网、高尔基体、溶酶体、液泡和细胞核膜，这些膜结构是相互流动的，处于动态平衡，在功能上也是相互协同的。

蛋白质分选是指细胞对新蛋白的识别、挑选，并通过特殊方式运送靶位点的过程。内膜系统是蛋白分选的主要系统。

内质网是由一层单位膜所形成的囊状、泡状和管状结构，并形成一个连续的网膜系统。它可分为糙面内质网和光面内质网。光面内质网的功能有：糖原分解释放葡萄糖、类固醇激素的合成、脂的合成与运转、解毒和调节钙离子浓度等。

糙面内质网的功能主要是参与蛋白质的合成与运输。实验证明，信号肽对于蛋白质合成的分选具有决定作用。信号肽长度一般为 15～35 个氨基酸，没有特异性。信号肽通过与信号识别颗粒、停靠蛋白的相互作用将新合成的蛋白质引导到内质网上，新生肽进入内质网腔后除了要进行正确的折叠外，还要经过蛋白质 *N*-糖基化和形成脂锚定蛋白。

高尔基体是蛋白质的分选站，它由内侧网络、中间囊膜和外侧网络 3 部分功能区室组成。

高尔基体的功能主要是蛋白质和脂运输、蛋白质的糖基化、蛋白聚糖的合成、蛋白原的水解和蛋白质的分选。

溶酶体是动物细胞中一种单层膜包被的膜结合细胞器。溶酶体可分为初级溶酶体、次级溶酶体和后溶酶体，次级溶酶体又可分为自噬性、异噬性和混合性溶酶体。

溶酶体的功能有吞噬作用、自噬作用、自溶作用和细胞外的消化作用等。

细胞的分泌活动涉及内质网、高尔基体和细胞质膜，可分为组成型和调节型两种。前者不需任何信号触发，后者则相反。分泌活动的过程主要包括蛋白质的合成、分选、加工和胞吐作用。

胞吐作用的相反过程是内吞作用，它可分为吞噬作用、吞饮作用和受体介导的内吞作用。受体介导的内吞作用的典型例子是低密度的脂蛋白和转铁蛋白结合铁离子的内吞运输。还有一种特殊的内吞作用就是转胞吞作用。

根据外被蛋白质的不同，将膜泡分为：披网格蛋白小泡、COPII 被膜小泡和 COPI 被膜小泡。披网格蛋白小泡的形成需网格蛋白、衔接蛋白和发动蛋白的参与。COPI 被膜小泡的形成需装配反应因子（ARF）和外被体蛋白质 I 的参与。

分泌小泡寻靶可用 SNARE 假说解释。Rab 蛋白可调节小泡运输与融合。

膜的合成是通过不断地将脂和蛋白插入已有的膜。磷脂的插入是通过磷脂运转蛋白，或通过出芽和膜融合。而膜整合蛋白则来源于糙面内质网，细胞内侧的外周蛋白则是由游离核糖体合成的。

10 细胞骨架与细胞运动

在 20 世纪初，细胞被看成是由悬浮在胞质溶胶中的各种独立的细胞器的集合体。随着电子显微镜和各种染色技术的发展，揭示细胞除了含有各种细胞器外，在细胞质中还有一个三维的网络结构系统（图 10-1），这个系统被称为细胞骨架（cytoskeleton）。

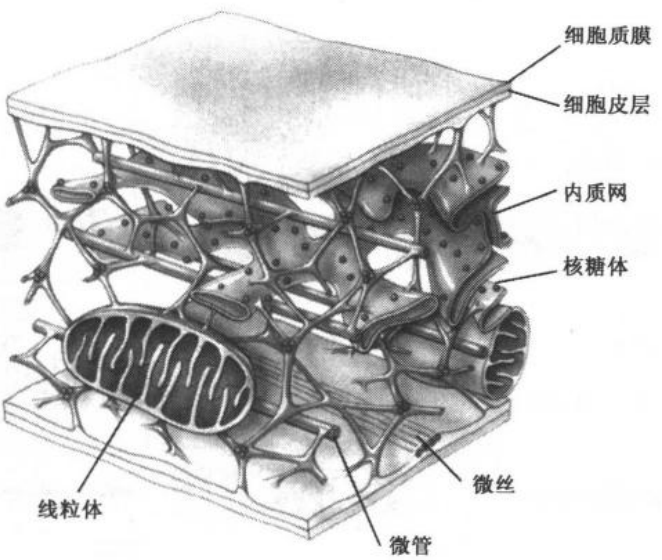


图 10-1 细胞骨架系统（引自 Raven *et al.*，1989）

10.1 细胞骨架的组成和功能

细胞除了具有遗传和代谢两个主要特性之外，还有两个特性，就是它的运动性和维持一定的形态。细胞的运动是生物进化的重要成就。初始的细胞可能是不动的，只能靠气流带动迁移。随着多细胞生物的进化，形成了可运动的器官。在成年的生物体内，仍有细胞是运动的，如保卫细胞要消灭外来生物的感染，必须能够出击。

体内的大多数细胞是稳定的，但是形态要发生很大的变化，如肌细胞的收缩、神经轴的伸长、细胞表面突起的形成、细胞有丝分裂时的缢缩等。大多数运动是发生在细胞内的，如染色体分离、胞质环流和膜泡运输等。细胞内外的运动性是生长和分化的基本要素，并且是受严格控制的。细胞所有运动都是机械运动，需要燃料（ATP）和蛋白质，将贮存在 ATP 中的能量转变成动力。细胞骨架是细胞运动的轨道，也是细胞形态的维持和变化的支架。

10.1.1 细胞骨架的组成和分布

细胞骨架是细胞内以蛋白质纤维为主要成分的网络结构，由主要的 3 类蛋白质纤丝（filament）构成，包括微管、微丝、中间纤维。每一种蛋白质纤丝都是由不同的蛋白质亚基组成，如微管蛋白是微管的亚基、肌动蛋白是肌动蛋白纤丝的亚基，而中间纤维则是由一类纤维蛋白家族组成的。各种纤丝都是由上千个亚基装配成不分支的线性结构，有时交叉贯穿在整个细胞之中。

微管主要分布在核周围，并呈放射状向胞质四周扩散；微丝主要分布在细胞质膜的内侧；而中间纤维则分布在整个细胞中（图 10-2）。虽然各种蛋白质纤维在细胞内具有相应的位置，但不是绝对的。

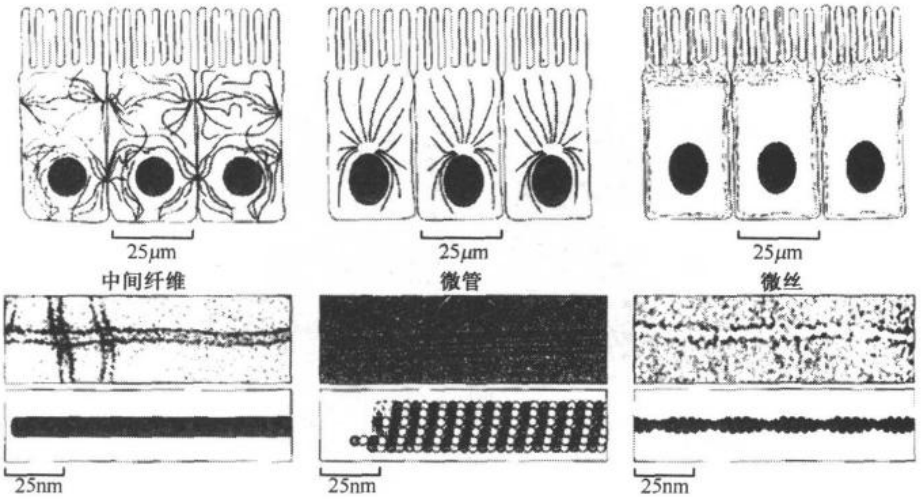


图 10-2　细胞骨架的 3 类主要成分及其分布（引自 Alberts *et al*., 1994）

10.1.2 细胞骨架的功能

细胞骨架对于维持细胞的形态结构及内部结构的有序性以及在细胞运动、物质运输、能量转换、信息传递和细胞分裂等一系列方面起重要作用。

作为支架（scaffold）。为维持细胞的形态提供支持结构，例如红细胞质膜的内部主要是靠以肌动蛋白纤维为主要成分的膜骨架结构维持着红细胞的结构。

在细胞内形成一个构架（framework）结构。为细胞内的各种细胞器提供附着位点。胞质溶胶中具有各种功能不同的细胞器，而且每种细胞器的数量又多，如果这些细胞器都漂浮在胞质溶胶中，作用时势必会互相干扰，而细胞骨架为这些细胞器提供附着位点，所以细胞骨架是胞质溶胶的组织者，将细胞内的各种细胞器组成各种不同的体系和区域网络。

为细胞内的物质和细胞器的运输及运动提供机械支撑。例如从内质网产生的膜泡向高尔基体的运输。由胞吞作用形成的吞噬泡向溶酶体的运输等通常都是以细胞骨架作为轨道的；在有丝分裂和减数分裂过程中染色体向两极的移动以及含有神经细胞产生的神经递质的小泡向神经细胞末端的运输都要依靠细胞骨架的机械支持。

为细胞从一个位置向另一位置移动提供力。一些细胞的运动，如假足的形成也是由细胞骨架提供机械支持。典型的单细胞靠纤毛和鞭毛进行运动，细胞的这种运动器官主要是由细胞骨架构成的。

为信使 RNA 提供锚定位点，促进 mRNA 的翻译。用非离子去垢剂提取细胞成分可发现细胞骨架相当完整，许多与蛋白质合成有关的成分同不被去垢剂溶解的细胞骨架结合在一起。

参与细胞的信号转导。有些细胞骨架成分常同细胞质膜的内表面接触，这对于细胞外环境中的信号在细胞内的转导起重要作用。

是细胞分裂的机器。有丝分裂的两个主要事件，核分裂和胞质分裂都与细胞骨架有关，细胞骨架的微管通过形成纺锤体将染色体分开，而肌动蛋白丝则将细胞一分为二。

细胞骨架的字义概念往往会给人以错觉，认为它是不动的框架结构。其实，它与人类社会所见和所说的框架的意义完全不同。首先，细胞骨架不是惰性结构，而是一种高度动态的组织，它们的装配、去装配和再装配都很快。第二，在细胞骨架的诸多功能中，最基本的两个功能是：使细胞维持一定的形态和使细胞具有运动的能力，包括肌体的运动和细胞器的移动，其他作用都是在这两个功能的基础上拓展的，而细胞骨架的动态性质则是最重要的。

另外细胞骨架在起作用时需要一些相关蛋白质的参与，这些蛋白质虽然不属于细胞骨架的组成部分，但是对于细胞骨架行使功能具有重要作用。

10.1.3 细胞骨架的研究方法

由于细胞骨架在细胞运动、物质运输、能量转换、信息传递和细胞分化等一系列方面起重要作用，所以对细胞骨架的研究是近代细胞生物学中最活跃的研究领域之一。

10.1.3.1 荧光显微镜在细胞骨架研究中的应用

荧光显微镜主要用来研究细胞骨架的动力学。例如，细胞骨架的蛋白质亚基能够同小分子的荧光染料共价结合，使细胞骨架带上荧光标记并发出荧光。这样就可以追踪细胞骨架蛋白在细胞活动中的作用，包括装配、去装配、物质运输等。这种方法还有一个好处，就是在活细胞时就可以观察。

另外，也可用荧光抗体研究以很低浓度存在的蛋白质在细胞内的位置，因为标记的荧光抗体同特异的蛋白质具有很高的亲和性，只要有相应的蛋白质存在，就一定会有反应，因为这种反应是特异的，通过荧光显微镜观察就可确定。荧光抗体既可以直接注射活细胞进行反应，也可以加到固定的细胞或组织切片中进行反应和分析。用这种方法对微管、肌动蛋白纤维、中间纤维进行了成功定位（图 10-3）。

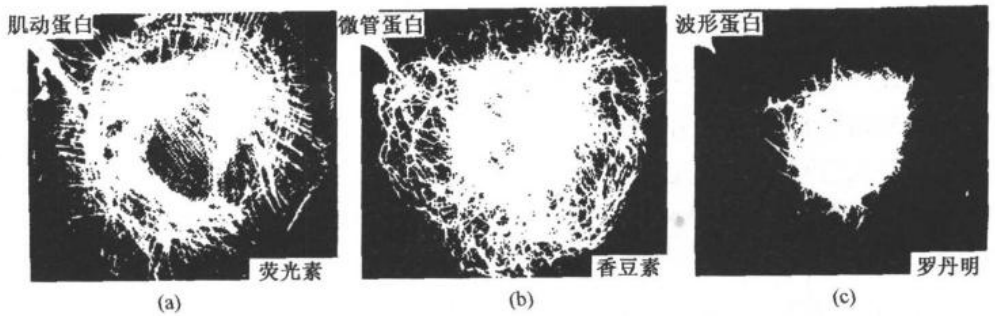


图 10-3　相同细胞中微管、微丝和中间纤维的荧光定位（引自 Karp，1996）

3 种不同荧光染料探针同相应的蛋白纤维结合从而使细胞内的纤维被染色。(a) 含有肌动蛋白的纤维被蘑菇毒素鬼笔环肽标记；(b) 含微管蛋白的微管被微管蛋白的抗体标记；(c) 中间纤维被抗波形蛋白的抗体标记。3 种混合的荧光标记物，各自的光都不强，并且各自的荧光波长不同。检查时，用不同的滤光片，每次滤去两种光。

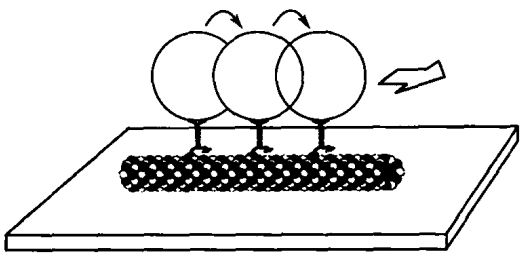


图 10-4　用电视显微镜观察到的微管发动机的运动示意图（引自 Karp，1996）

为 25nm 的微管、直径为 40nm 的运输泡等。这一技术的发展导致一种观察分子发动机（molecular motor）移动方法的产生。在典型的实验中，将微管样品放在载玻片上，然后通过聚焦的激光束系统将含有分子发动机的样品直接放到微管上，在合适的条件下，可在电视屏幕上观察分子发动机能够以 ATP 为能量来源沿着微管移动（图 10-4）。

10.1.3.2　电视显微镜

强化光学显微镜功能的一种方法就是用照相机将细胞的活动记录在胶片上并可在电视屏幕上显示，即电视显微镜（video microscope）。这种显微镜的照相机具有特别的反差、数码和计算机处理等 3 个特点。用这种照相机能够使显微镜观察比自身分辨率低的物质，并进行照相，如观察直径

10.1.3.3　电子显微技术的应用

细胞骨架的一个很特别的性质是在非离子去垢剂，如 Triton X-100 处理时保持非溶解状态。当用这类去垢剂处理细胞时，可溶性的物质、膜成分被抽提出来，留下细胞骨架，并且同活细胞中的结构完全一样。根据这一特性，采用金属复型技术在电子显微镜下观察到细胞骨架的基本排列（图 10-5）。

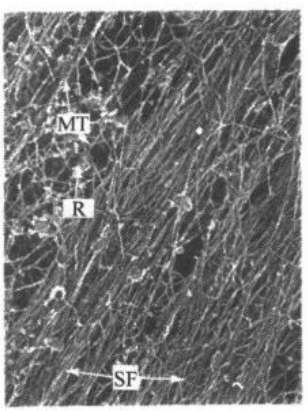


图 10-5　细胞骨架的电子显微镜检查（引自 Karp，1996）

用非离子去垢剂 Triton X-100 处理成纤维细胞，并进行冰冻干燥和金属复型的细胞骨架。SF 表示的是成束的微丝，MT 表示微管；R 是多聚核糖体。

10.2 微　　管

微管（microtubule，MT）是细胞质骨架系统中的主要成分，1963 年首先在水螅细胞中发现。同年，在植物中也发现了微管。如同它的名称所提示，微管是一中空的管状结构。

10.2.1 微管的结构和类型

微管是直径为 24～26nm 的中空圆柱体。外径平均为 24nm，内径为 15nm。微管的长度变化不定，在某些特化细胞中，微管可长达几厘米（如中枢神经系统的运动神经元）。微管壁大约厚 5nm，微管通常是直的，但有时也呈弧形。细胞内微管呈网状和束状分布，并能与其他蛋白质共同组装成纺锤体、基体、中心粒、纤毛、鞭毛、轴突、神经管等结构。

10.2.1.1 微管的基本构件——微管蛋白

微管是以微管蛋白（tubulin）异源二聚体为基本构件，螺旋盘绕形成的。在每根微管中微管蛋白二聚体头尾相接，形成细长的原纤维（protofilament），13 条这样的原纤维纵向排列组成微管的壁（图 10-6）。

组成微管的球形微管蛋白是 α 微管蛋白（α-tubulin）和 β 微管蛋白（β-tubulin），这两种微管蛋白具有相似的三维结构，能够紧密地结合成二聚体，作为微管装配的亚基。

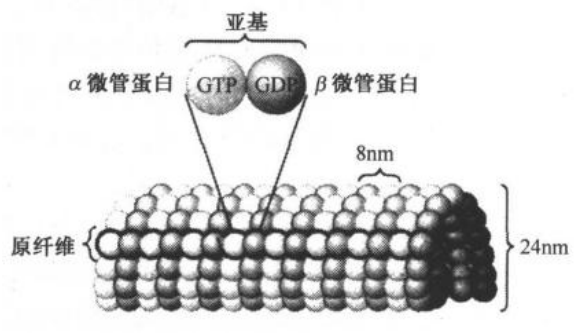


图 10-6　微管的结构（引自 Lodish *et al*.，1999）

α 和 β 微管蛋白都由 450 个氨基酸组成，它们的分子质量约 55kDa。这两种亚基有 35%～40%的氨基酸序列同源，表明编码它们的基因可能是由同一原始祖先演变而来。另外，这两种微管蛋白与细菌中一种叫做 FysZ 的 GTPase（分子质量为 40kDa）同源，这种酶具有和微管蛋白相似的功能，能够聚合并且参与细胞分裂。

α 和 β 微管蛋白都是直径为 4nm 的球形分子，所以这种异源二聚体的长度为 8nm。

每一个微管蛋白二聚体有两个 GTP 结合位点，一个位于 α 亚基，是不可逆的 GTP 结合位点，结合上去的 GTP 不能被水解，也不能被 GDP 替换。另一个位于 β 亚基上，结合在该位点上的 GTP 能够被水解成 GDP，所以这个位点又称为可交换位点（exchangeable site，E 位点）。通过光亲和标记法和蛋白酶水解实验已经确定了 β 亚基上形成 E 位点的结构域。多肽链 63～77 位的氨基酸序列结合 GTP 的嘌呤部分，180～183 位的氨基酸序列结合 GTP 的核糖部分，GTP 的磷酸部分的结合区域由 142～148 位的氨基酸（主要是甘氨酸）残基组成。

10.2.1.2 微管的类型

微管有单体、双联体和三联体（图 10-7）。

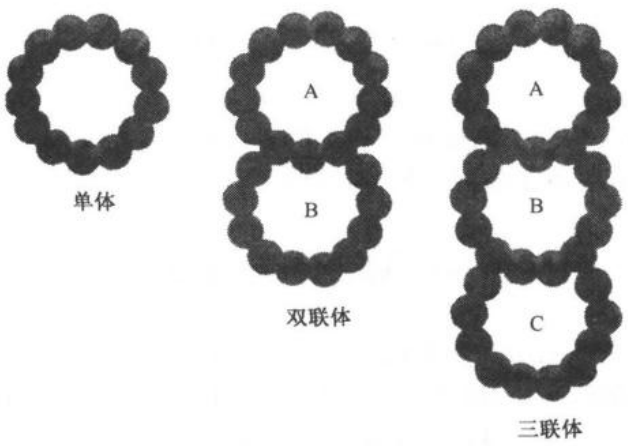


图 10-7　三种微管排列方式（引自 Lodish *et al*., 1999）
图示是三种微管的横切面。

在多数情况下，微管都是以简单的单体（singlet）存在，大部分细胞质微管是单体微管，它在低温、Ca^{2+}和秋水仙素作用下容易解聚，属于不稳定微管。虽然绝大多数单体是由 13 根原纤维组成的一个管状结构，在极少数情况下，也有由 11 根或 15 根原纤维组成的微管，如线虫神经节微管就是由 11 或 15 条原纤维组成。

双联体（doublet）是构成纤毛和鞭毛的周围小管，是运动类型的微管，它对低温、Ca^{2+}和秋水仙素都比较稳定。组成双联体的单管分别称为 A 管和 B 管，其中 A 管是由 13 根原纤维组成，B 管是由 10 根原纤维组成，所以双联体是由两个单体融合而成的，一个双联体只有 23 根原纤维。

三联体（triplet）见于中心粒（centriole）和基体（basal body），由 A、B、C 三个单管组成，A 管由 13 根原纤维组成，B 管和 C 管都是 10 根原纤维，所以一个三联体共有 33 根原纤维。三联体对于低温、Ca^{2+}和秋水仙素的作用是稳定的。

根据微管的稳定性，可分成两类：稳定的长寿微管和动态的短寿微管。当微管的结构需要快速装配和去装配的时候，微管就是动态的。例如细胞在有丝分裂开始时，纺锤体的快速形成即是微管的装配，在有丝分裂结束时，纺锤体的消失就是细胞质微管的快速去装配，所以纺锤体微管是动态的短寿微管。在一些不进行复制的细胞中含有稳定长寿的微管结构，如纤毛中的微管束结构。

10.2.2　微管装配的动力学

除了特化细胞的微管外，大多数细胞质微管都是不稳定的，能够很快地组装（assembly）和去组装（disassembly）。低温、提高Ca^{2+}浓度、用某些化学试剂（如秋水仙素）处理生活细胞都会破坏细胞质微管的动态变化，这些化学试剂与微管蛋白亚基或同微管多聚体结合，阻止微管的组装或去组装。

10.2.2.1 微管装配的起始点：微管组织中心

存在于细胞质中决定微管在生理状态或实验处理解聚后重新装配的结构叫微管组织中心（microtubule organizing center，MTOC）。在多数情况下 MTOC 是一种中心体，但是某些表皮细胞和新受精的卵细胞，有很多 MTOC，它们看起来并不像中心体。尽管如此，在有丝分裂中，仍将中心体看成是微管形成的组织者。

MTOC 的主要作用是帮助大多数细胞质微管装配过程中的成核反应，微管从 MTOC 开始生长，这是细胞质微管装配的一个独特的性质，即细胞质微管的装配受统一的功能位点控制（图 10-8）。

中心体（centrosome）是动物细胞中决定微管形成的一种细胞器，包括中心粒和中心粒旁基质（pericentriolar matrix）。在细胞间期，位于细胞核的附近，在有丝分裂期，位于纺锤体的两极。

中心粒是中心体的主要结构，成对存在，即一个中心体含有一对中心粒，且互相垂直形成“L”形排列。中心粒直径为 0.2μm。长为 0.4μm，是中空的短圆柱状结构。圆柱的壁由 9 组间距均匀的三联管组成，三联管是由 3 个微管组成，每个微管包埋在致密的基质中。组成三联管的 3 个微管分别称 A、B、C 纤维，A 伸出两个短臂，一个伸向中心粒的中央，另一个反方向连到下一个三联管的 C 纤维，9 组三联管串联在一起，形成一个由短臂连起来的齿轮状环形结构（图 10-9）。

中心体并非是惟一的 MTOC，基体是纤毛和鞭毛的微管组织中心，不过基体只含有一个中心粒而不是一对中心粒。其他类型的细胞具有不同类型的 MTOC，如真菌的细胞有初级 MTOC，称为纺锤极体（spindle pole body）。

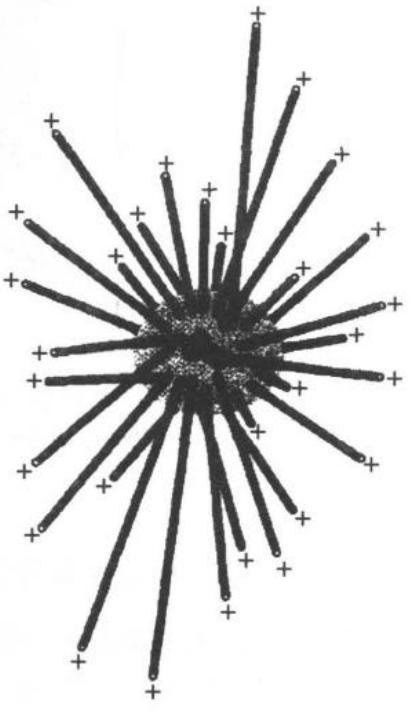


图 10-8 微管从微管组织中心向外生长
阴影部分是 MTOC，包含中心粒和中心体。图中标出了生长中微管的正端（+），靠近 MTOC 部分是微管的负端（-）。

MTOC 不仅为微管提供了生长的起点，而且还决定了微管的方向性。靠近 MTOC 的一端由于生长慢而称之为负端（minus end），远离 MTOC 一端的微管生长速度快，被称为正端（plus end），所以（+）端指向细胞质基质，常常靠近细胞质膜。在有丝分裂的极性细胞中，纺锤体微管的（-）端指向一极，而（+）端指向中心，通常是纺锤体的（+）端同染色体接触。

神经细胞中微管的指向是一个例外。在树突中，没有明显的 MTOC，树突中的微管既有（+）端指向神经细胞体，也有（-）端指向神经细胞体。但是在轴突中，所有微管的极性相同。

植物细胞既没有中心体，又没有中心粒，植物细胞中的 MTOC 是细胞核外被表面的成膜体（phragmoplast）。

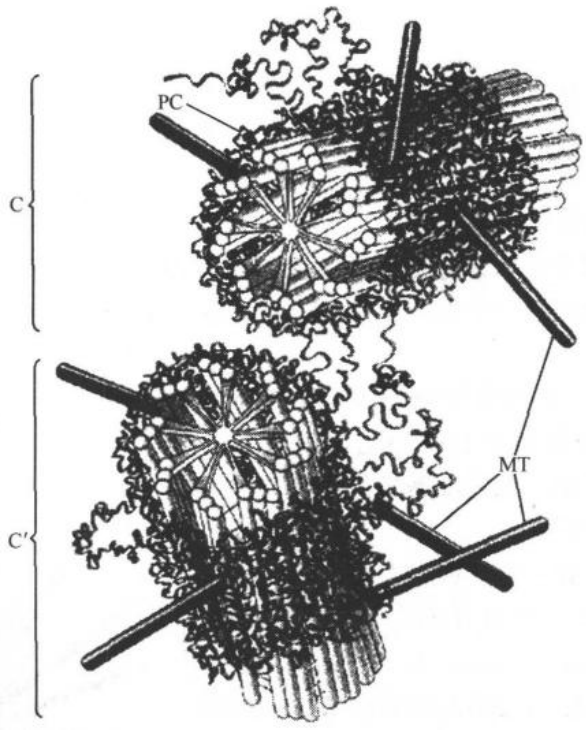


图 10-9　中心粒结构（引自 Lodish *et al*.，1995）
图示一对中心粒，每个中心粒都是由 9 个三联管组成。微管从中心粒上开始形成。
C、C′分别表示两个中心粒。

10.2.2.2　γ微管蛋白在微管装配中的作用

虽然组成微管的亚基是α、β微管蛋白二聚体，但是存于中心体的另一种微管蛋白，即γ微管蛋白对微管的形成具有重要作用（图 10-10）。通过遗传学的研究，发现γ微管蛋白通过与β微管蛋白的相互作用帮助微管成核（nucleation）。

细胞中的γ微管蛋白大约有 80％是一种 25S 复合体的一部分，这种复合物从蛙的卵细胞以及果蝇的胚中分离出来。该复合体被称为γ微管蛋白环复合体（γ-tubulin ring complex，γ-TuRC），因为用电子显微镜观察似一个环。体外实验已经证明γ微管蛋白在微管的装配中起关键作用。

10.2.2.3　微管的组装过程

细胞内有αβ微管蛋白亚基库，在正常情况下，αβ微管蛋白亚基可以装配成完整的微管。但细胞内微管的聚合和解聚在时间上和空间上都受到严格的控制。在间期细胞中，细胞质微管与微管蛋白亚基库处于动态平衡之中。胞质微管的装配和去装配的动态平衡受细胞周期调控。在分裂前期，胞质微管网络中微管去装配，游离的微管蛋白亚基组装为纺锤体；分裂末期，发生逆向转变。

离体实验表明，微管蛋白的体外组装分为成核和延长（elongation）两个反应，其中成核

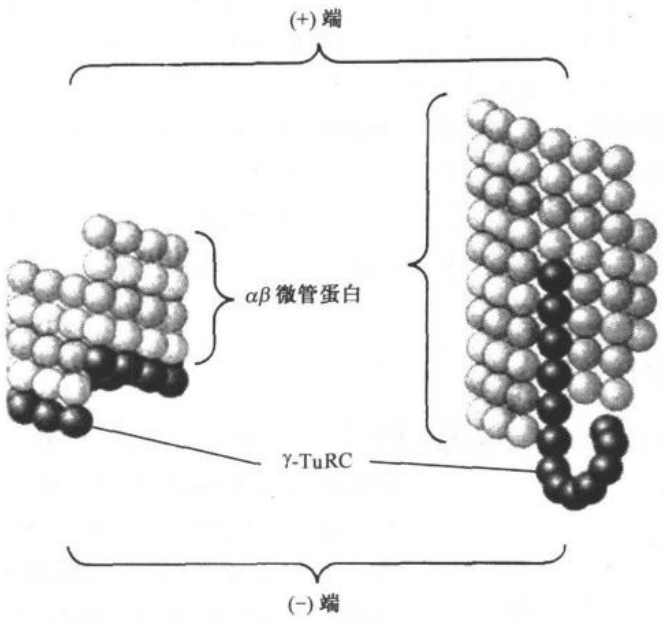


图 10-10　γ 微管蛋白介导微管装配的两种模型（引自 Lodish *et al*., 1999）
在这两个模型中，γ 微管蛋白先形成一个圆环（左）或形成钩环结构（右），γ 微管蛋白的这种结构可指导微管蛋白二聚体结合上去并进行微管的装配。

反应是微管组装的限速步骤。成核反应结束时，形成很短的微管，此时二聚体以比较快的速度从两端加到已形成的微管上，使其不断加长。虽然在体外组装过程中二聚体可以在微管的两端加减，然而在大多数体外实验的条件下，二聚体的加减优先在微管的一端进行，这一端被称为正端（+），另外一端则被称为负端（−）。

根据体外实验的结果推测所有微管都遵循同一原则由相似的蛋白亚基装配而成，但体内的装配过程要比体外装配复杂。主要装配过程是：首先，α 微管蛋白和 β 微管蛋白形成长度为 8nm 的 αβ 二聚体，αβ 二聚体先沿纵向聚合形成一个短的原纤维，这种原纤维可能是不够稳定

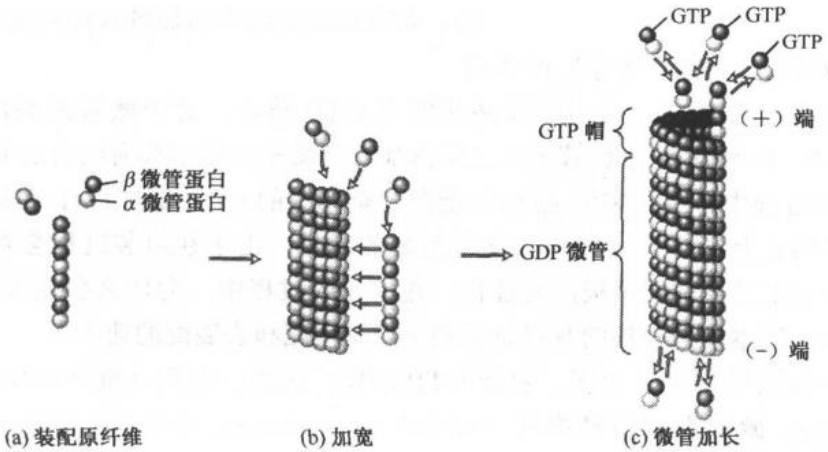


图 10-11　微管的装配过程（引自 Lodish *et al*., 1999）

的。第二步是以原纤维为基础，经过侧面增加二聚体而扩展为弯曲的片状（sheet）结构，这种片状结构的稳定性大大提高。第三步是 αβ 二聚体平行于长轴重复排列形成原纤维。当螺旋带加宽至 13 根原纤维时，即合拢形成微管的壁。游离的、在 β 微管蛋白的交换位点结合有 GTP 的 αβ 微管蛋白二聚体再不断加到这一微管的端点使之延长。在同一根微管的 13 条原纤维中，所有 αβ 二聚体的取向都是相同的。在 αβ 二聚体微管蛋白掺入到新生微管之后不久，β 亚基上的 GTP 被水解成 GDP，如果聚合作用比水解作用快，那么，就会在微管的一端产生结合有 GTP 的帽子结构，这就是（+）端，通常（+）端聚合作用的速度是（-）端聚合作用的两倍（图 10-11）。

10.2.2.4 微管的极性

微管的极性有两层含义，一是装配的方向性，二是生长速度的快慢。由于微管是以 αβ 二聚体作为基本构件进行装配的，并且是以首尾排列的方式进行组装，所以每一根原纤维都有相同的极性（方向性），这样，装配成的微管的一端是 α 微管蛋白亚基组成的环，而相对的一端是以 β 微管蛋白亚基组成的环。极性的另一层含义是两端的装配速度是不同的，（+）端生长得快，（-）端则慢，同样，如果微管去组装也是（+）端快（-）端慢（图 10-12）。

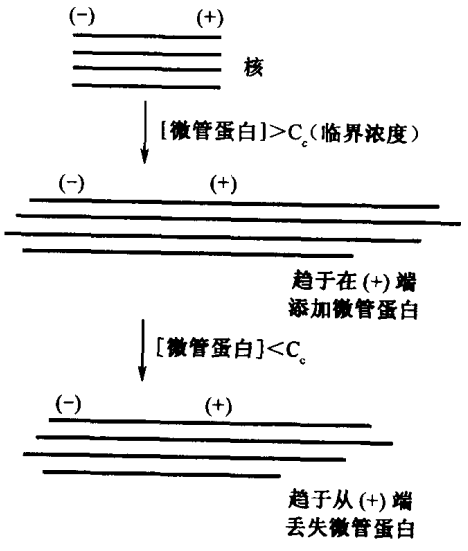


图 10-12 微管装配时的极性
（引自 Lodish *et al.*, 1999）

10.2.2.5 影响微管组装和去组装的因素

1972 年，Weisenberg 首次在体外组装微管获得成功。他将脑的匀浆物置于 37℃，然后添加 Mg^{2+}、GTP 和 EGTA（EGTA 是 Ca^{2+} 的螯合剂，抑制聚合作用）即可进行微管的组装。还发现，只要降低或提高反应温度就可以使微管去组装和重组装；若在反应系统中添加微管碎片能够加速微管的组装，加入的微管碎片可起“种子”的作用。

聚合过程需要加入 GTP，因为 β 亚基能够同 GTP 结合。对于微管的装配来说不需要 GTP 水解成 GDP，但是发现 αβ 微管蛋白二聚体加入到微管之后不久所结合的 GTP 就被水解成 GDP。去组装过程中释放出来的 αβ 微管蛋白二聚体上的 GDP 要与 GTP 交换，使 αβ 微管蛋白二聚体重新结合上 GTP，才能作为微管组装的组件。由于在组装过程会发生 GTP 的水解，所以微管的装配是一个费用极高的过程。在进化的过程中，为什么会让微管的组装发展成需要花如此大的成本？最合理的解释是有利于控制装配和去装配的速率。

造成微管不稳定性的因素很多，包括 GTP 浓度、压力、温度（最适温度为 37℃）、pH（最适 pH 为 6.9）、微管蛋白临界浓度（critical concentration, Cc）、药物等（图 10-12、图 10-13）。

但是也有一些因素使微管处于稳定的不解聚状态，包括某些微管结合蛋白、药物以及修

饰微管的酶。例如有一些酶在微管装配之后对微管蛋白进行修饰使微管处于稳定状态，典型的例子是微管 α 亚基的乙酰化和去酪氨酸作用。微管蛋白的乙酰化是由微管蛋白乙酰化酶催化的，它能够将乙酰基转移到微管蛋白特定的赖氨酸残基上；去酪氨酸作用是由微管去酪氨酸酶（detyrosinase）催化的，它能够除去 α 微管蛋白 C 端的酪氨酸残基。

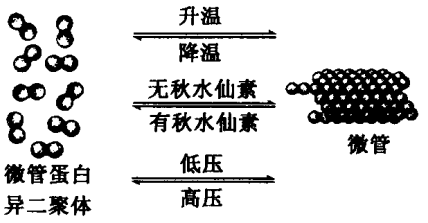


图 10-13　影响微管稳定性的某些条件
（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

10.2.2.6　影响微管稳定性的药物

科学家很早就发现有几种药物能够抑制与微管的装配和去装配有关的细胞活动，后来这些药物就成为研究微管功能的有力工具。其主要原因有二：一是这些药物只同微管或微管蛋白二聚体结合；二是它们在细胞中的浓度很容易控制。这些药物中用得最多的是秋水仙素、紫杉醇等（图 10-14）。

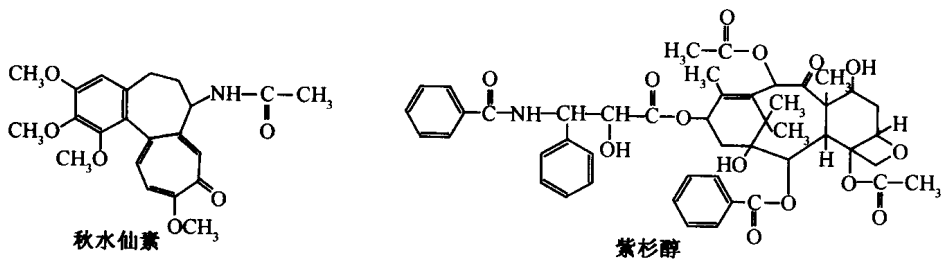


图 10-14　秋水仙素与紫杉醇的分子结构

秋水仙素（colchicine）是一种生物碱，能够与微管特异性结合。秋水仙素结合到未聚合的微管蛋白二聚体上。在每一个二聚体上有一个与秋水仙素高亲和结合位点和一个低亲和的结合位点，后一个结合位点在秋水仙素浓度较低的情况下可能没有作用。从机理上看，秋水仙素同二聚体的结合，形成的复合物可以阻止微管的成核反应。秋水仙素和微管蛋白二聚体复合物加到微管的正负两端，可阻止其他微管蛋白二聚体的加入或丢失。所以秋水仙素定位到微管的末端，改变了微管组装和去组装稳定状态的平衡，其结果破坏了微管的动态性质。

不同浓度的秋水仙素对微管的影响不同。用高浓度的秋水仙素处理细胞时，细胞内的微管全部解聚，但是用低浓度的秋水仙素处理动物和植物细胞，微管保持稳定，并将细胞阻断在中期。将这种处理的细胞用无秋水仙素的溶液洗涤之后，细胞的分裂功能恢复正常，这对于获得同步化的细胞非常有用。

紫杉醇（taxol）是红豆杉属植物中的一种复杂的次生代谢产物，也是目前所了解的惟一一种可以促进微管聚合和稳定已聚合微管的药物。同位素示踪表明，紫杉醇只结合到聚合的微管上，不与未聚合的微管蛋白二聚体反应。细胞接触紫杉醇后会在细胞内积累大量的微管，这些微管的积累干扰了细胞的各种功能，特别是使细胞分裂停止于有丝分裂期，从而影响了细胞的正常分裂。

某些除草剂是植物细胞特有的与微管结合的药物。已经发现的具有这种性质的除草剂有

两类：二硝基苯胺（dinitroaniline）和磷酸酰胺（phosphoricamide），它们同微管蛋白的结合改变了微管的聚合能力和其他一些功能。

10.2.2.7 微管装配的动力学行为：动态不稳定性

微管在体外组装时发现有两个因素决定微管的稳定性：游离微管蛋白的浓度和 GTP 水解成 GDP 的速度。高浓度的微管蛋白适合微管的生长，低浓度的微管蛋白引起 GTP 的水解，形成 GDP 帽，使微管解聚。GTP 的低速水解适合于微管的连续生长，而快速的水解造成微管的解聚。细胞内的微管处于动态不稳定（dynamic instability）状态。

踏车（treadmilling）　又称轮回，是微管组装后处于动态平衡的一种现象（图10-15）。微管的两端都可以加上 αβ 二聚体，或释放 αβ 二聚体。但在（+）端，由于结合有 GTP 帽结构的存在，同二聚体的亲和力高，所以，新结合上去的比释放出来的快。但在（-）端，由于 GTP 已水解成 GDP，同二聚体的亲和力低，释放出来的二聚体比结合上的快，这样，（+）端生长得快，（-）端生长得慢，结合上二聚体的 GTP 又不断水解，向（-）端推移。如果（+）端结合上去的与（-）端释放出来的速度相同，就会形成轮回现象，即微管的总长度不变，但结合上的二聚体从（+）端不断向（-）端推移，最后到达（-）端。造成这一现象的原因除了 GTP 水解之外，另一个原因是反应系统中游离蛋白质的浓度。当（+）端的游离微管蛋白二聚体的浓度高于临界浓度，而（-）端游离微管蛋白二聚体的浓度低于临界浓度就会发生踏车现象。踏车现象实际上是一种动态稳定现象。

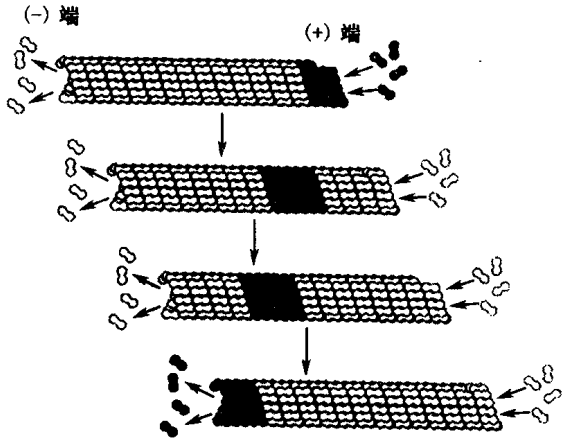


图 10-15　微管的装配与去装配：踏车现象
（引自 Kleinsmith *et al.*，1995）

所谓 αβ 微管蛋白二聚体的临界浓度就是微管进行组装和去组装的转换浓度，高于此浓度进行组装，低于此浓度进行去组装。因为微管是动态结构，细胞中存在大量的 αβ 微管蛋白二聚体，其浓度也是处于不断的变化之中。由于 αβ 微管蛋白二聚体的两个亚基都能结合 GTP，所以有两种形式的 αβ 微管蛋白二聚体，一种是刚从微管中脱下的，这种 αβ 微管蛋白二聚体是 GTP-GDP 型，另外一些 αβ 微管蛋白二聚体的两个亚基都结合有 GTP，是 GTP-GTP 型。所谓（+）端的 αβ 微管蛋白二聚体的临界浓度是指达到组装的最低浓度。

动态不稳定性：生长或缩短　微管的踏车行为使单个微管的长度保持不变，而组成微管的蛋白二聚体发生了变化。实际上，细胞内的微管常常是处于生长和缩短的动荡状态（图 10-16）。

造成微管的这种不稳定性的主要因素是微管正端的帽结构。如果微管正端结合的是由结合 GTP 的微管蛋白二聚体组成的帽结构，微管就趋于生长，如果微管的正端结合的是由结合 GDP 的微管蛋白二聚体组成的帽结构，这种微管就趋于缩短。决定微管正端是 GTP 帽还是 GDP 帽，又受两种因素影响，一是结合 GTP 的游离微管蛋白二聚体的浓度，二是 GTP 帽中

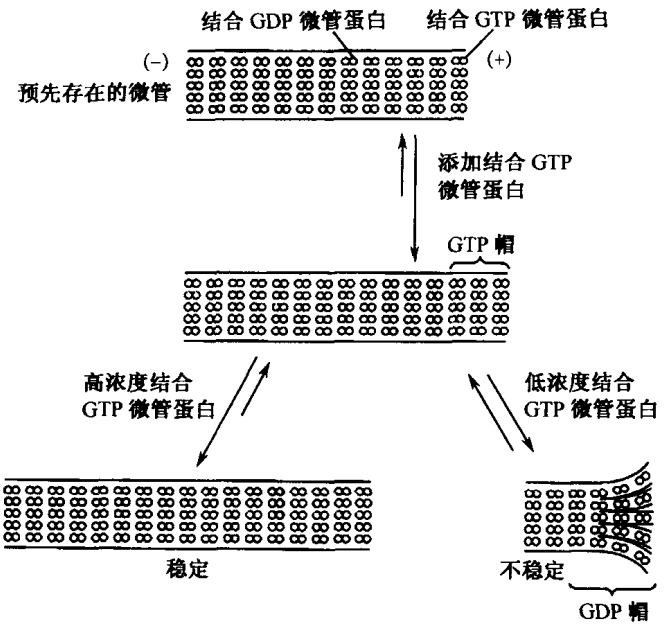


图 10-16　微管的动态不稳定性：生长或缩短（引自 Lodish *et al*., 1995）

GTP 水解的速度。

当（+）端形成 GTP 帽，而游离微管蛋白二聚体的浓度又很高时，微管趋向于生长。由于结合 GTP 的游离微管蛋白二聚体的浓度降低，引起微管延长的速率下降，随着 GTP 水解的不断进行最后 GTP 帽结构转变成 GDP，逐渐使微管变得不稳定，趋于解聚。细胞内微管的这两种状态是不断发生的，因为细胞内不断有微管解聚，又不断地有新微管的组装。

10.2.3　微管结合蛋白

将细胞裂解后分离微管，并在 4℃下处理使微管去聚合，将冷处理的样品进行离心，除去不溶性的物质，然后将含有微管蛋白二聚体的上清液于 37℃温育，让微管装配。但是，经过多次装配-去装配分离纯化的微管蛋白制品中仍然含有少量的其他蛋白质。有与微管蛋白共纯化的蛋白质存在，说明这些蛋白质是与微管蛋白特异性结合的，而不是非特异蛋白质的污染。免疫荧光显微镜观察培养细胞也发现有与微管蛋白结合的蛋白质存在，后来将这一类微管辅助蛋白称为微管结合蛋白（microtubule-associated protein，MAP），在微管结构中约占 10%～15%。

10.2.3.1　微管结合蛋白的种类和结构特点

根据序列分析的结果，将 MAP 分成两个主要的类型：I 型和 II 型。MAP1A 和 MAP1B 属于 I 型，含有几个重复的氨基酸序列：Lys-Lys-Glu-X，作为同带负电的微管蛋白结合的位点。这些位点可中和微管中微管蛋白间的电荷，维持聚合体的稳定。MAP1A 和 MAP1B 是存在于神经组织的轴突和树突中大的纤维状的蛋白质分子，在其他非神经细胞中也有发现。这

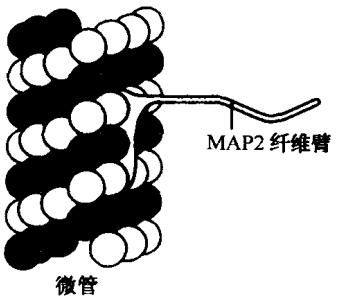


图 10-17　微管聚合蛋白 MAP2
（引自 Karp，1996）

两种蛋白质都是从同一种前体肽衍生而来，在细胞内通过酶解产生一个重链和一个轻链。

II 型 MAP 包括 MAP2、MAP4、Tau。这些蛋白有几个与微管蛋白结合的 18 氨基酸重复序列。MAP2 存在于树突，有两个结构域，一个是碱性的微管蛋白结合结构域，另一个是酸性的外伸的结构域。外伸的结构域像是从微管壁上伸出的纤维臂（图 10-17），从微管上伸出的臂能与膜、中间纤维和其他微管结合，形成交联桥。MAP4 是最为广泛的微管结合蛋白，既存在于神经细胞，又存在于非神经细胞。在细胞分裂时，MAP4 可调节微管的稳定性。Tau 是比其他 MAP 都要小的分子，存在于轴突和树突中。Tau 有 4～5 种不同的形式，是 Tau 前 mRNA 可变剪接的结果。Tau 可使微管交联成束，使树突中的微管维持稳定。

至今发现的 MAP 大多数存在于脑组织中，只有少数几种广泛存在于各种细胞中（表 10-1）。

表 10-1　某些微管结合蛋白

蛋白质	分子质量/kDa	来源
MAP1A	350	神经组织
MAP1B（MAP5）	325	神经组织
MAP2A，MAP2B	270	神经组织
MAP2C	70	神经组织
Tau 蛋白	50～65	神经组织
MAP4	200	广泛存在
MAP3	180	广泛存在
发动蛋白	100	神经组织

10.2.3.2　MAP 的功能

MAP 具有多方面的功能：①使微管相互交联形成束状结构，也可以使微管同其他细胞结构交联，这些结构包括质膜、微丝和中间纤维等；②通过与微管成核点的作用促进微管的聚合；③在细胞内沿微管转运囊泡和颗粒；④提高微管的稳定性。

MAP 同微管的结合可以改变微管的动力学性质。MAP 外伸的部分能够被 MAP 蛋白激酶磷酸化，而被磷酸化了的 MAP 就不再与别的微管结合，因而促使微管去装配。另外，MAP 蛋白激酶还参与许多信号转导途径，提示 MAP 也是细胞外信号的靶位点。MAP，特别是 MAP4 能够被周期蛋白 2（cdc2）蛋白激酶磷酸化，表明 MAP 与细胞周期的调控也相关。

10.2.4 分子发动机

通常用“路通财通”来形容一个地区发达程度。其实路通财通的真正含义还在于有先进的运输工具。我们不难想象当今社会如果没有先进的交通运输工具，社会不可能有如此进步。细胞社会也同人类社会一样，需要有先进的运输工具，以保证细胞社会的正常运转。

发动机是一种能够将化学能或电能转变成机械能的机器。例如汽车的引擎能够将汽油的化学能转变成机械能驱动汽车向前运动。

细胞内有一类蛋白质能够通过类似的方式，利用 ATP 供能产生推动力，进行细胞内物质运输或运动，这种蛋白分子被称为发动机蛋白（motor protein），或分子发动机。图 10-18 是假设的分子发动机的工作模型，它不同于火车沿着铁轨运输货物，而是靠它的臂同固定轨道的结合并不停地摆动向前推进。

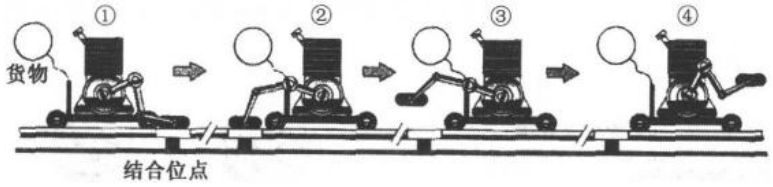


图 10-18 假设的分子发动机运输模型（引自 Karp，1996）

①在一次机械活动的循环中，发动机与轨道的结合点结合；②在力的驱动下，发动机进行机械运动；③发动机与结合点脱离；④发动机回到原来的位置；开始新的循环。

10.2.4.1 分子发动机的类型

实际上，分子发动机是细胞内一类利用 ATP 作为动力在细胞内行走的蛋白质。至今所发现的分子发动机可分为 3 个不同的家族：肌球蛋白（myosin）家族、驱动蛋白（kinesin）家族、动力蛋白（dynein）家族。

其中驱动蛋白和动力蛋白是以微管作为运行的轨道，而肌球蛋白则是以肌动蛋白纤维作为运行的轨道。尚不知道有以中间纤维为运行轨道的发动机分子。细胞骨架的发动机分子是化学机械转化器，它将化学能（ATP）转变成机械能，以此运送细胞内的货物，包括：各种类型的小泡、线粒体、溶酶体、染色体和其他的细胞骨架纤维等。

10.2.4.2 分子发动机运输的主要特点

分子发动机引导的运输有两个主要的特点：第一，运输是单方向的，一种发动机分子只能引导一种方向的运输。例如驱动蛋白只能引导沿微管的（－）端向（＋）端的运输，而动力蛋白则是驱动从（＋）端向（－）端运输。第二，运输方式是逐步行进而不像火车的轮子连续运行。之所以要逐步进行，是因为分子发动机要通过一系列的构型变化才能完成行进的动作。分子发动机所用的能源是 ATP，利用 ATP 作为能源是一个复杂的过程。首先要将 ATP 分子结合到分子发动机上，然后进行水解产生 ADP 和 P_i，接着要将这些产物从发动机分子上释放出来，然后再结合一个新的 ATP 分子，开始下一个循环，不断从一个位置移向另

一个位置（图 10-19）。

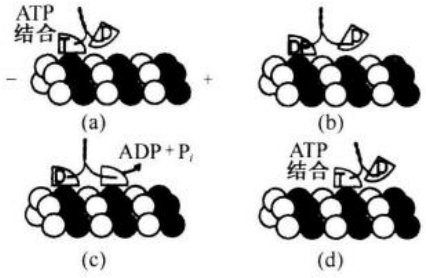


图 10-19　ATP 驱动的分子发动机行进（a）结合 ATP；（b）ATP 水解产生力；（c）发动机行进，释放 ADP；（d）结合新的 ATP 开始新的循环。

10.2.4.3　驱动蛋白的结构和功能

驱动蛋白是 1985 年从鱿鱼的轴质（axonplasm）中分离的一种发动机蛋白。驱动蛋白是一个大的复合蛋白，由几个不同的结构域组成，包括两条重链和一条轻链（图 10-20），总分子质量为 380kDa。它有一对球形的头，这是产生动力的“电机”；还有一个扇形的尾，是货物结合部位。驱动蛋白是类驱动蛋白（kinesinlike protein）超家族中的一个成员，它们的头部序列相似，说明在微管上的运输作用类似；它们之间在尾部序列是不同的，说明它们运输的货物是不同的。神经细胞中驱动蛋白的功能是将膜泡以及其他的细胞器从神经细胞的细胞体运向轴突末端。

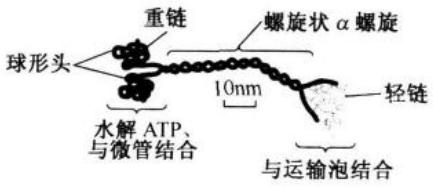


图 10-20　驱动蛋白的结构（引自 Lodish *et al*., 1999）

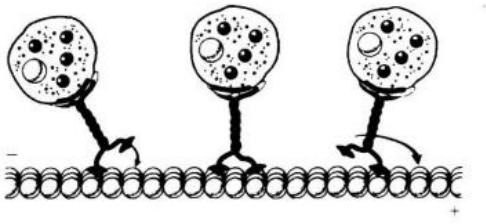


图 10-21　驱动蛋白的运输方式（引自 Karp, 1996）

体外实验证明驱动蛋白的运输具有方向性，从微管的（－）端移向微管的（＋）端所以驱动蛋白是（＋）端走向的微管发动机（plus end-directed microtublar motor）。由于神经轴中所有的微管都是（＋）端朝向轴突的末端，而（－）端朝向细胞体，所以驱动蛋白在神经细胞中负责正向的运输任务。

分子发动机运输时是 ATP 依赖性的，一个驱动蛋白沿一条原纤维运输，移动的速度与 ATP 的浓度有关，速度高时，可达到每秒 900nm。在低 ATP 的浓度时，驱动蛋白移动的速度相当慢，可以观察到它移动的方式。驱动蛋白每跨一步的长度为 8nm，正好是一个 αβ 微管蛋白二聚体的长度（图 10-21），因此可以推测，驱动蛋白一次在微管轨道上移动两个球形亚基。

类驱动蛋白不限于神经细胞，它们存在于所有的真核细胞，参与 ER 产生的各种小泡的运输。

10.2.4.4　细胞质动力蛋白

1963 年发现的第一个与微管相关的发动机蛋白是与纤毛和鞭毛运动有关的动力蛋白。在当时，虽然推测在细胞质中也有这种蛋白的存在，但是一直等到 20 年后才从哺乳动物脑组织

中分离鉴定到细胞质动力蛋白（cytoplasmic dynein）。

细胞质动力蛋白是一个巨大的分子，分子质量超过 10 万，由 9～10 个多肽链组成。它有两个大的球形的头部，是生成力的部位。它在细胞中至少有两个功能：第一是有丝分裂中染色体运动的力的来源；第二是作为负端微管走向的发动机，担负小泡和各种膜结合细胞器的运输任务。在神经细胞中，细胞质动力蛋白参与将细胞质细胞器向神经节的细胞体运输。在成纤维细胞中，细胞质动力蛋白负责将细胞器，包括高尔基体小泡、溶酶体和内体等向细胞中心运输的任务。体外分析表明，细胞质动力蛋白在微管上移动的方向与驱动蛋白相反，从（+）端移向（-）端，由此看来，细胞质动力蛋白与驱动蛋白在运输功能上都是一样的，只不过运输的方向不同（图 10-22）。

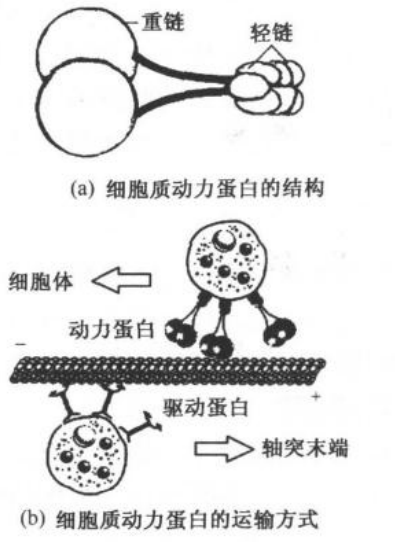


图 10-22　细胞质动力蛋白的结构与运输作用（引自 Karp，1996）

10.2.5　微管的功能

微管在细胞内的作用大致可分为 4 个方面，首先是起支架作用，为细胞维持一定的形态提供结构上的保证，并给各种细胞器进行定位；第二是作为细胞内物质运输的轨道；第三是作为纤毛和鞭毛运动元件；第四是参与细胞的有丝分裂和减数分裂。

10.2.5.1　支架作用

维持细胞形态是微管的基本功能。实验证明，微管具有一定的强度，能够抗压和抗弯曲，这种特性给细胞提供了机械支持力。微管能够维持细胞的形态，使细胞不至于破裂。在培养的动物细胞中，微管围绕细胞核向外呈放射状分布(图10-23)。微管能够帮助细胞产生极性，确定方向。例如神经细胞的轴突中就有大量平行排列的微管，确定神经细胞轴突的方向。

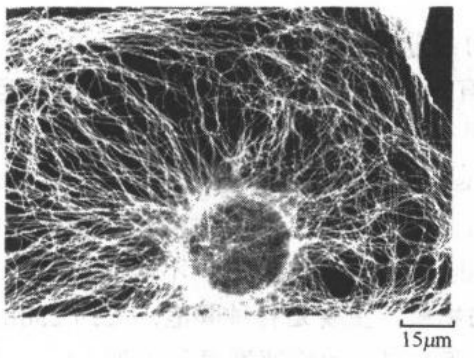


图 10-23　培养的动物细胞中的微管（引自 Karp，1996）

在植物细胞中，微管对细胞形态的维持也有间接的作用。在植物细胞质膜的下面有成束微管形成的皮层带，这种皮层带影响纤维素合成酶在细胞质膜中的定位。其结果是产生的纤维素纤维与微管平行排列。反过来，细胞壁中纤维素纤维的方向对于决定细胞的生长特性及形态都具有重要的作用。

此外，微管对于维持细胞内部的组织也有重要作用。用破坏微管的药物处理细胞，发现能够严重影响膜细胞器，特别是高尔基体在细胞内的位置。高尔基体在细胞内的位置一般在细胞的中央，刚好在细胞核的外侧，用秋水仙素处理细胞后，高尔基体分散存在于四周；若除去药物，微管装配，高尔基体又恢复其细胞内的正常位置。

10.2.5.2 细胞内物质运输

微管在核的周围分布密集，并向胞质外周伸展。在线粒体周围也有微管的存在，有的微管直接连到高尔基体小泡上；核糖体可系在微管及微丝的交叉点上。所以，细胞内的细胞器移动和胞质中的物质转运都和微管有着密切的关系。

轴突运输

在神经元细胞中，轴突末端到细胞体的距离很长，并且轴突末端要释放大量的神经递质，所以神经元必须不断供给大量的物质，包括蛋白质、膜，以补充因轴突部位的胞吐而丧失的成分。这些新的物质来自何方？因为核糖体只存在于神经细胞的细胞体和树突中，在轴突和轴突末梢没有蛋白质的合成。所以蛋白质和膜必须在细胞体中合成，然后运输到轴突，这就是轴突运输（axonal transport）。

轴突中填满了各种细胞骨架结构，包括微管束、中间纤维以及以各种方式互连的微管等。研究表明，轴突中以微管为基础的运输有两种方式：顺向运输和逆向运输（图 10-24）。

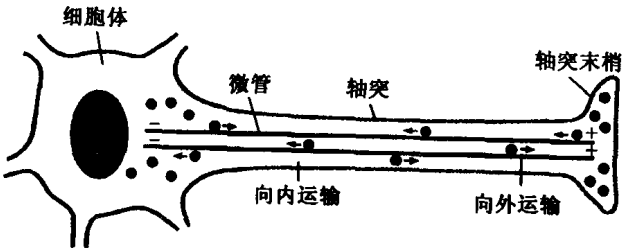


图 10-24 轴突中微管发动机运输的两种方式（引自 Alberts *et al*., 1998）

神经细胞的细胞体是神经细胞的中心，是圆形的部分。细胞体中有细胞核、内质网、高尔基体以及其他的细胞器。细胞体中合成的蛋白质有些以分泌小泡的形式向轴突末梢运输，如神经递质等。这些分泌小泡主要是靠驱动蛋白通过微管运向轴突末梢，这叫向外运输（outward transport），又称顺向运输（anterograde transport）。轴突末梢膜内吞形成的内吞泡从末梢向细胞体部的运输则是由细胞质动力蛋白沿微管向内运输的，这种方向的运输称为向内运输（inward transport），或称为逆向运输（retrograde transport）。另外，不同的物质其运输的速度是不同的，可分为 3 类：第一类是快速运输的物质，主要是各种膜泡，大约 250mm/d（3μm/s）。第二类是慢速运输物质，主要是聚合的骨架蛋白，运输速度每天不到 1mm。像线粒体之类的细胞器的运输速度介于二者之间，是第三类物质。

色素颗粒的运输

许多两栖类生物的皮肤和鱼类的鳞片中含有特化的色素细胞，在神经和激素的控制下，这些细胞中的色素颗粒可在数秒钟内迅速分布到细胞各处，从而使皮肤颜色变深；又能很快

回到细胞中心，而使皮肤颜色变浅，以适应环境的变化（图 10-25）。研究发现，色素颗粒的运输是微管依赖性的，色素颗粒实际上是沿微管转运的。

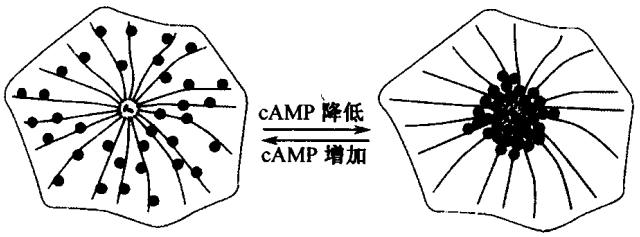


图 10-25　鱼的色素细胞中色素分子的分散与聚集（引自 Alberts *et al*., 1998）

我们在第 9 章讨论了内膜系统和蛋白质的转运，其中主要是小泡运输。其实，这些小泡进行的蛋白质运输，都是以微管作为轨道的。将细胞质中以微管为轨道运输的发动机蛋白和运输物的关系总结于表 10-2 和图 10-26。

表 10-2　微管发动机蛋白的功能分类

类　别	运 输 物	运输方向
细胞质驱动蛋白	胞质溶胶小泡	(+)
纺锤体驱动蛋白	纺锤体和星微管，中心粒、动粒	(+) 或 (-)
细胞质动力蛋白	在有丝分裂和减数分裂期运输胞质溶胶小泡，动粒	(-)
轴丝动力蛋白	纤毛和鞭毛中单管	(-)

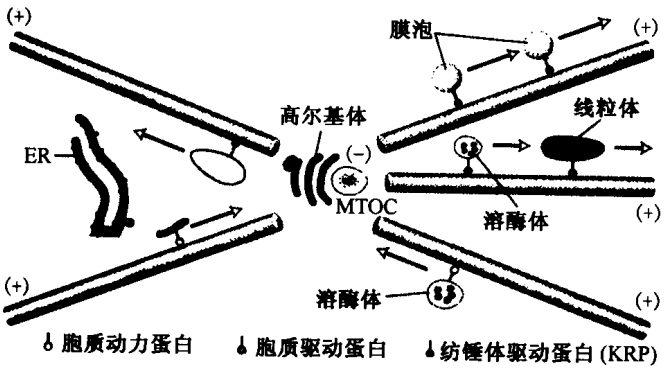


图 10-26　细胞中微管介导的物质运输（引自 Lodish *et al*., 1999）

10.2.5.3　纤毛和鞭毛：结构和功能

在各种含有微管的细胞结构中，对真核细胞的纤毛（cillum）和鞭毛（flagellum）的结构和功能了解得最为清楚。纤毛和鞭毛都是某些细胞表面的特化结构，具有运动功能。纤毛和鞭毛并无绝对界限，一般把少而长者称为鞭毛，短而多者称为纤毛（图 10-27）。纤毛和鞭毛有两个主要的功能：第一是帮助细胞锚定在一个地方，使自己不易移动；第二是使细胞在液

体介质中运动。

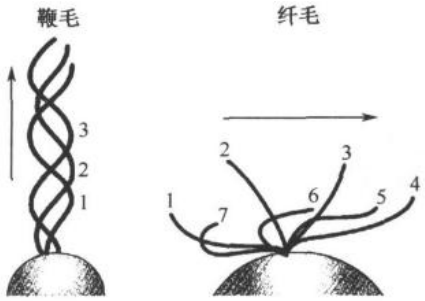


图 10-27　鞭毛与纤毛
（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

鞭毛和纤毛在大小、数量和运动方式等方面都是不同的。鞭毛长度可达 150μm，数量较少，并且是波浪式摆动。而纤毛较短，平均长度为 5～10μm，运动的方式比较复杂，且没有规则。

纤毛和鞭毛的结构

纤毛和鞭毛都含有一个规则排列的由微管相互连接形成的骨架，称为轴丝（axoneme）。1954 年 Fawcett 和 Porter 首次描述了轴丝的结构。轴丝的外面由膜包裹。组成轴丝的微管呈规律性排列，即 9 组二联管在周围成等距离地排列成一圈，中央有两根单个的微管，成为“9＋2”的微管形式。中央的两个微管之间由细丝相连，外包有中央鞘。周围的 9 组二联管，近中央的一根称为 A 管，另一条为 B 管（图10-28）。

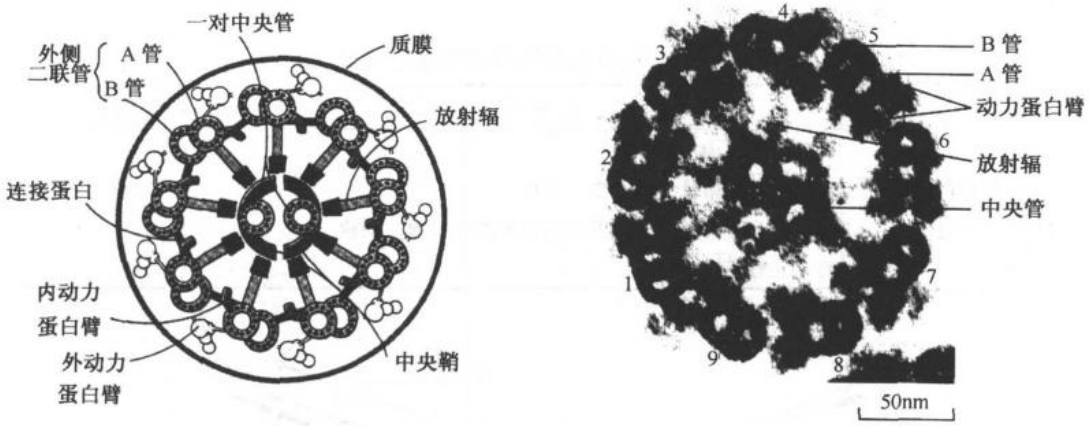


图 10-28　典型的真核细胞的纤毛或鞭毛结构组成（引自 Becker *et al*., 1996）

A 管上有两个短臂长约 15nm，粗约 5nm，两个短臂之间的间隔约 24nm。内臂指向邻近一对微管的 B 微管，组成臂的成分是动力蛋白。纤毛的动力蛋白是一种多亚基的 ATP 酶，能为 Ca^{2+}、Mg^{2+} 所激活。

中央微管和 A 管是完全微管，由 13 条原纤维组成。B 微管只有 10 条原纤维，有 3 条是同 A 微管共用的，故每组周围微管的原纤维共有 23 条。在两个相邻二联管之间有微管连接蛋白（nexin）将相邻微管二联体结合在一起。另外，每个二联管的 A 管上有放射辐条（radial spoke）与中央微管鞘相连。

对组成纤毛的成分进行了分子鉴定。首先逐步降解分离的纤毛，然后通过低速离心除去完整的细胞，分离纤毛之后用去污剂除去质膜，得到轴丝。再用 EDTA 处理轴丝，当 EDTA 螯合了 Mg^{2+} 之后，动力蛋白被释放到溶液中，此时用显微镜进行检查，发现每一个二联管的两个臂以及一对中央管都不存在了，说明这些结构是由动力蛋白构建的。进一步的实验证

明，动力蛋白就是微管的臂而不是二联管。

纤毛中的微管排列并不始终如一，在纤毛顶部每组微管逐渐减为一条，达到顶端时，它们就相互融合。每一纤毛的基部起始于细胞浅表部的基体（basal body），基体的结构与中心粒相同，它缺少两根中央微管，而周围 9 组是三联管（图 10-29）。

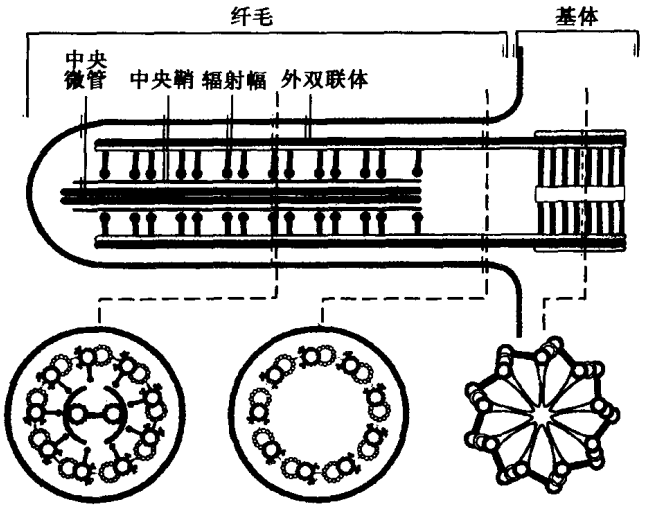


图 10-29　基体与纤毛/鞭毛轴丝（引自 Karp，1996）

纤毛动力蛋白

纤毛动力蛋白（ciliary dynein）是一种多头的发动机蛋白（图 10-30）。在电子显微镜下观察，纤毛动力蛋白像是具有 2～3个头的一束花，每一支花都是由一个大的球形结构域和一个小的球形结构域组成，中间通过一个小的杆部同基部相连。纤毛动力蛋白的基部同 A 管相连，而头部同相邻的 B 管相连。头部具有 ATP 结合位点，能够水解 ATP。

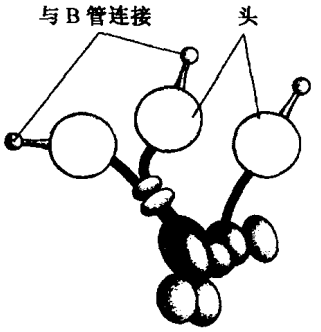


图 10-30　纤毛动力蛋白的结构（引自 Karp，1996）

纤毛和鞭毛的运动机制：微管滑动模型

纤毛和鞭毛的运动是一种简单的弯曲，这种弯曲是由轴丝中微管动力臂引起微管的滑动所致，微管滑动模型（sliding-microtubule model）是关于纤毛和鞭毛运动机制的最好解释。这一模型的主要内容是：纤毛和鞭毛的动力蛋白头部与相邻二联管的 B 微管接触，促进同动力蛋白结合的 ATP 水解，并释放 ADP 和 P_i；由于 ATP 水解，改变了 A 微管动力蛋白头部的构象，促使头部朝向相邻二联管的正端滑动，使相邻二联微管之间产生弯曲力；新的 ATP 结合，促使动力蛋白头部与相邻 B 微管脱离；ATP 水解，使动力蛋白头部的角度复原；带有水解产物的动力蛋白头部与相邻二联管的 B 微管上的另一位点结合，开始下一个循环（图10-31）。

10.2.5.4　纺锤体和染色体运动

微管在细胞的有丝分裂中起重要作用。有丝分裂涉及许多复杂的力学过程。首先，染色

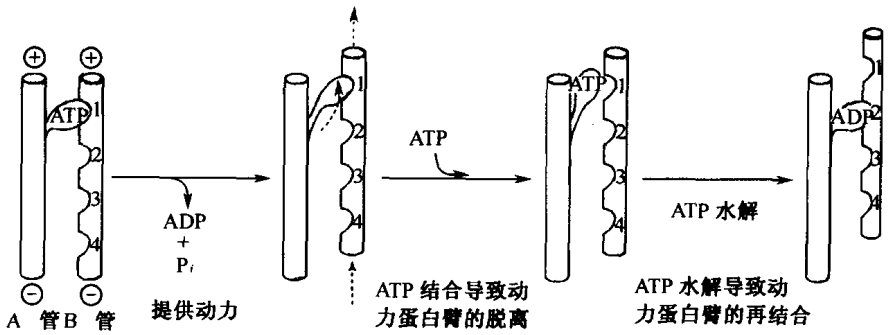


图 10-31 纤毛/鞭毛动力微管的滑动模型（引自 Kleinsmith *et al.*，1995）

体必须在中期排列到赤道板上，到了后期已经在 S 期复制的子染色体要分开，分别被移动到母细胞相对的两极。此外在胞质分裂中，细胞还必须保证每一个子细胞得到适量的母性细胞器和细胞骨架蛋白等。在所有这些过程中，微管均起重要作用。一方面，微管通过形成有丝分裂纺锤体来组织染色体的运动，另一方面微管还在有丝分裂过程中出现的亚细胞运动中起作用。关于染色体运动机理将在细胞周期一章中介绍。

10.3 微　　丝

微丝（microfilament，MF）又称肌动蛋白纤维（actin filament），由肌动蛋白（actin）组成的、直径为7～9nm 的纤维。微丝是双股肌动蛋白丝以螺旋的形式组成的纤维，两股肌动蛋白丝是同方向的。肌动蛋白纤维也是一种极性分子，具有两个不同的末端，一个是（+）端，另一个是（-）端。

10.3.1 微丝的形态和组成

10.3.1.1 微丝的形态与分布

微丝比微管细，更具有弹性，通常比微管短。细胞中微丝的数量比微管多，全部微丝加

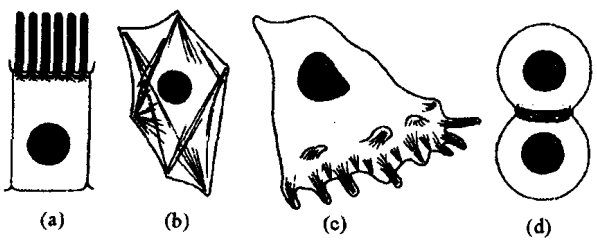


图 10-32 细胞中的肌动蛋白束（引自 Alberts *et al.*，1998）
（a）微绒毛；（b）细胞质中的收缩束；（c）运动细胞前缘的片状伪足和丝状伪足；（d）细胞分裂时的收缩环。

起来，其总长度大约是微管的 30 倍。微丝在细胞中通常成束存在（图 10-32），这种成束的微丝比单个的肌动蛋白纤维的强度大得多。

微丝首先发现于肌细胞中，在横纹肌和心肌细胞中肌动蛋白成束排列组成肌原纤维，具有收缩功能。微丝也广泛存在于非肌细胞中。在细胞周期的不同阶段或细胞流动时，它们的形态、分布可以发生变化。因此，非肌细胞的微丝同胞质微管一样，在大多数情况下是一种动态结构，以不同的结构形式来适应细胞活动的需要。

10.3.1.2 微丝的结构单位：肌动蛋白

肌动蛋白以两种形式存在（图 10-33），即单体和多聚体。单体的肌动蛋白是由一条多肽链构成的球形分子，又称球状肌动蛋白（globular actin，G-肌动蛋白），外形类似花生果。肌动蛋白的多聚体形成肌动蛋白丝，称为纤维状肌动蛋白（fibros actin，F-肌动蛋白）。在电子显微镜下，F-肌动蛋白呈双股螺旋状，直径为 8nm，螺旋间的距离为 37nm。

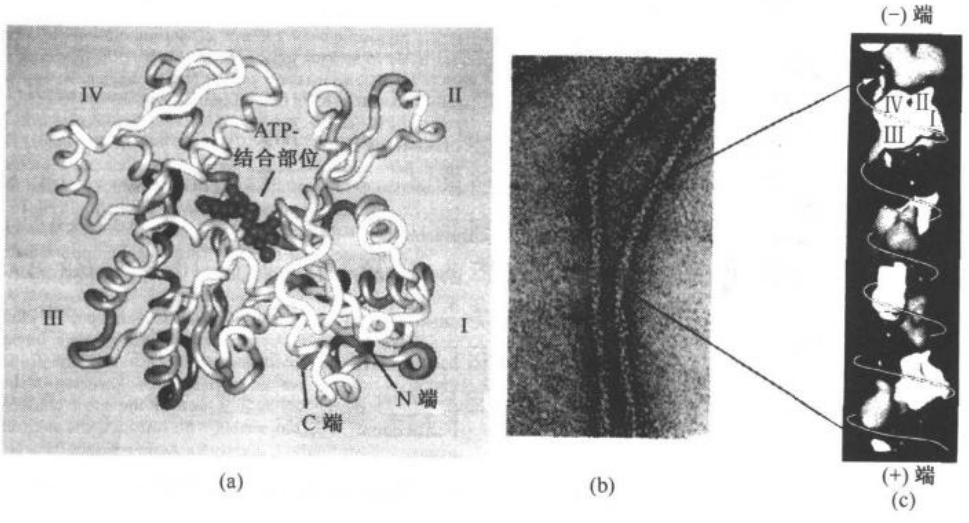


图 10-33 单体 G-肌动蛋白和纤维状 F-肌动蛋白的结构（引自 Lodish *et al*., 1999）

(a) 非肌细胞中 β-肌动蛋白单体的结构模型，像是扁平的分子，由体积相等的两个部分组成，中间有一个裂口，并且有 4 个结构域，用 I～IV 表示。ATP 在裂口的地方与肌动蛋白结合。N 端和 C 端位于结构域 I。(b) 电子显微镜观察的经负染的丝状肌动蛋白的形态。(c) 肌动蛋白纤维亚基的装配模型。

肌动蛋白是真核细胞中最丰富的蛋白质。在肌细胞中，肌动蛋白占总蛋白的 10%，即使在非肌细胞中，肌动蛋白也占细胞总蛋白的 1%～5%。肌动蛋白在非肌细胞的胞质溶胶中的浓度为 0.5mmol/L。在特殊的结构，如微绒毛（microvilli）中，局部肌动蛋白的浓度要比典型细胞中的浓度高 10 倍。

肌动蛋白是一种中等大小的蛋白质，由 375 个氨基酸残基组成，并且是由一个大的、高度保守的基因编码。单体肌动蛋白分子的分子质量为 43kDa，其上有 3 个结合位点。1 个是 ATP 结合位点，另两个都是与肌动蛋白结合的结合蛋白结合位点。

10.3.2 微丝装配的动力学

微丝是由肌动蛋白亚单位组成的螺旋状纤维。通过负染技术，在电子显微镜下观察，发现 F-肌动蛋白是一种长的、具有弹性的纤维，直径是可变的，平均在 7～9nm 之间。在体外，将 Mg^{2+}、K^{+}和 Na^{+}等无机离子加入到溶液中，能够诱导 G-肌动蛋白聚合成 F-肌动蛋白纤维。这个过程是可逆的，当降低溶液中离子的浓度，F-肌动蛋白纤维能够解聚成 G-肌动蛋白。G-肌动蛋白能够聚合成 F-肌动蛋白，F-肌动蛋白也可以解聚成 G-肌动蛋白，这是肌动蛋白最为重要的特性。

10.3.2.1 ATP 在装配中的作用

F-肌动蛋白是由 G-肌动蛋白装配而成的，在装配中 ATP 具有重要作用。球形的肌动蛋白是由两个裂片（lobe）构成的，像是两扇门，中间有一个裂（cleft），裂和裂片是肌动蛋白的 ATPase 的活性部位，能够结合 ATP 和 Mg^{2+}。G-肌动蛋白的两个裂片具有弹性，能够开与合。实际上，每一个 G-肌动蛋白通常都是结合有 Mg^{2+} 离子以及 ATP 或 ADP 的复合物，因此肌动蛋白通常有四种存在状态：ATP-G-肌动蛋白、ADP-G-肌动蛋白、ATP-F-肌动蛋白、ADP-F-肌动蛋白，在细胞中主要是以 ATP-G-肌动蛋白和 ATP-F-肌动蛋白两种形式存在（图 10-34）。当 ATP 或 ADP 与 G-肌动蛋白结合之后，会发生构型的改变。如果没有 ADP 或 ATP 与肌动蛋白结合，则很快变性。

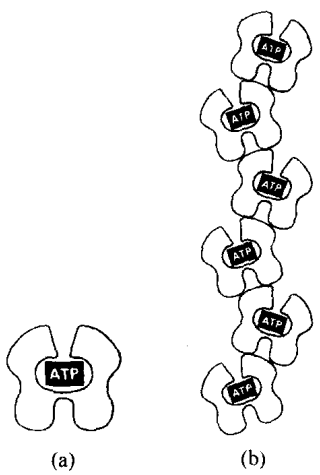


图 10-34 G-肌动蛋白与 F-肌动蛋白模式图（引自 Alberts *et al*., 1998）

(a) G-肌动蛋白；(b) F-肌动蛋白。

10.3.2.2 肌动蛋白纤维的装配

体外实验表明，肌动蛋白纤维的装配分 3 步进行，并且是 3 个连续的过程（图 10-35）。

第一个过程是成核，G-肌动蛋白慢慢地聚合形成短的、不稳定的寡聚体，该过程较慢。一旦寡聚体达到某一种长度（约 3～4 个亚基），它就可以作为“种子”，或者“核”，进入第二个过程：快速延长阶段。在延长阶段，G-肌动蛋白单体快速地从短纤维的两端添加上去。生长期可被已形成的 F-肌动蛋白的自发或突然断裂作用所加强，因为断裂的短 F-肌动蛋白纤维的末端可以作为新的核进行延长反应。可以在反应体系中添加小的 F-肌动蛋白纤维缩短成核期，或绕过成核作用。随着 F-肌动蛋白的不断生长，游离的 G-肌动蛋白单体的浓度越来越低，一直到同 F-肌动蛋白纤维的浓度相平衡。一旦达到这种平衡，F-肌动蛋白的装配进入第三阶段：稳定期（steady state）。之所以称为稳定期，是因为在这个时期，G-肌动蛋白同 F-肌动蛋白纤维末端上的亚基进行交换，但不改变 F-肌动蛋白纤维的量。单体的这种平衡浓度即为临界浓度（critical concentration，C_c）。在正常的体外条件下，C_c 是 0.1 μmol/L。高于该值，G-肌动蛋白倾向于聚合，低于该值，F-肌动蛋白将会解聚。

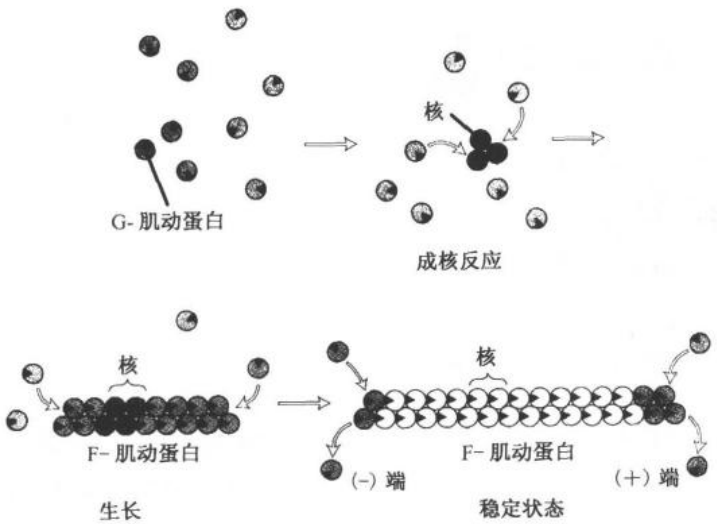


图 10-35　微丝装配的基本过程（引自 Lodish *et al*.，1999）

肌动蛋白的聚合过程伴随着 ATP 的水解。在聚合过程中，G-肌动蛋白先要结合 ATP，然后 ATP-G-肌动蛋白单体再结合到 F-肌动蛋白的两端，加到 F-肌动蛋白上。一旦 ATP-G-肌动蛋白单体结合到 F-肌动蛋白纤维上，同肌动蛋白结合的 ATP 就会慢慢降解成 ADP，并释放出 P_i（图 10-36）。由于 ATP 的水解，装配成的大多数纤维都是由 ADP-F-肌动蛋白纤维构成的，但是在纤维的一端是 ATP-F-肌动蛋白。虽然结合的 ATP 常被水解成 ADP，但是对于 F-肌动蛋白的装配来说，ATP 的水解不是必要的过程，因为含有 ADP 或不能水解的 ATP 类似物的 G-肌动蛋白装配后都是稳定的。

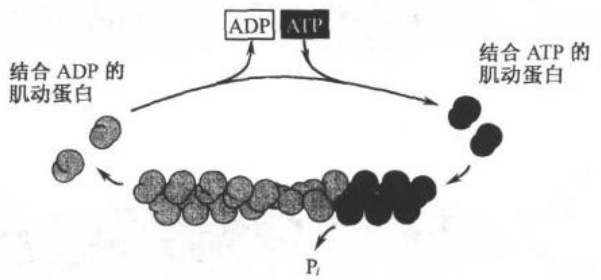


图 10-36　微丝装配过程中 ATP 的水解（引自 Alberts *et al*.，1998）

在肌动蛋白纤维的装配过程中，除了受 G-肌动蛋白临界浓度的影响，还受一些离子浓度的影响。如向 G-肌动蛋白溶液中添加 Mg^{2+}、K^+、Na^+，可诱导 G-肌动蛋白聚合成 F-肌动蛋白。该过程是可逆的，当这些离子的浓度较低时，F-肌动蛋白趋于去聚合，而在 Mg^{2+} 和高浓度 K^+ 或 Na^+ 的溶液诱导下，G-肌动蛋白则装配成纤维状肌动蛋白。利用这一特性，可以将肌动蛋白经过几次反复的聚合-解聚循环，从细胞中提纯出来。

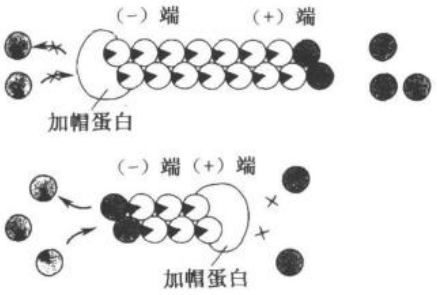


图 10-37 用加帽蛋白证明 F-肌动蛋白丝（+）端生长快于（-）端（引自 Lodish *et al*., 1999）
用肌动蛋白封端蛋白封住（-）端，微丝继续快速加长，但是用封端蛋白封住（+）端，F-肌动蛋白加长的速率非常慢。

10.3.2.3 微丝的动态性质

同微管一样，F-肌动蛋白也有结构上和功能上的极性（polarity）。由于构成 F-肌动蛋白的所有亚基都是从同一个方向加到多聚体上，所以 F-肌动蛋白丝具有方向性，结合 ATP 裂的一端为（-）端，另外一端为（+）端。而且，两端的生长速度是不同的，（+）端生长快，（-）端生长慢。一般而言，（+）端生长速度比（-）端快 5～10 倍，体外用加帽蛋白（capping protein）实验证明了这种现象（图 10-37）。

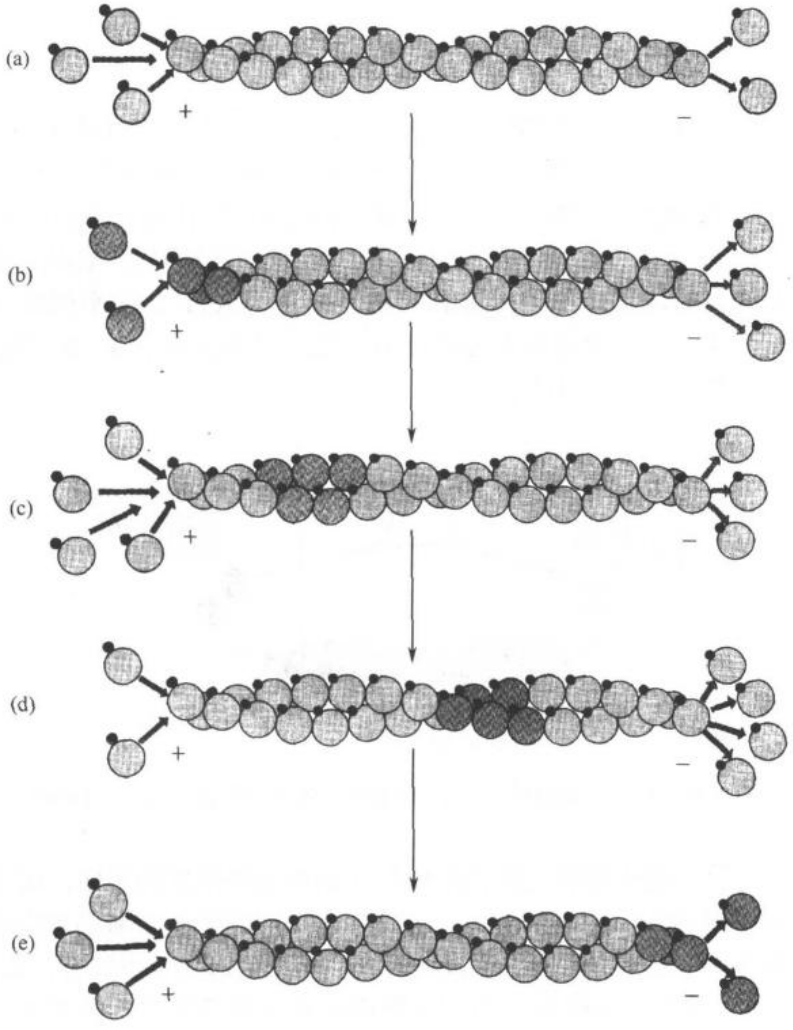


图 10-38 微丝的踏车现象（引自 Becker *et al*., 1996）

F-肌动蛋白功能上的极性是指行使功能时具有方向性，如以微丝作为运输轨道的发动机蛋白与微丝的结合则是按方向识别的。

踏车

在微丝装配时，若 G-肌动蛋白分子添加到 F-肌动蛋白丝上的速率正好等于 G-肌动蛋白分子从 F-肌动蛋白上失去的速率时，微丝净长度没有改变，这种过程称为肌动蛋白的踏车(图 10-38)。肌动蛋白踏车是由 G-肌动蛋白单体的临界浓度决定的，当 G-肌动蛋白的临界浓度处于正端和负端 G-肌动蛋白浓度之间时，就会出现踏车。

发生踏车时，虽然 F-肌动蛋白丝的净长度没有发生变化. 但是装配与去装配仍在进行，只不过添加到微丝上的 G-肌动蛋白分子与脱下来的速率相等。

微丝的动态平衡

在体内，有些微丝是永久性结构，如肌细胞中的细丝及上皮细胞微绒毛中的轴心微丝等。有些微丝是暂时性结构，如胞质分裂环中的微丝。

在大多数动物细胞中，大约有 70%的肌动蛋白是游离的单体或者和其他蛋白结合成小的复合物，在游离肌动蛋白分子和微丝之间存在着动态平衡。

10.3.2.4 影响肌动蛋白单体-多聚体平衡的毒素

同微管一样，肌动蛋白也受某些药物分子的影响。主要有 2 种毒素分子：细胞松弛素和鬼笔环肽，它们与肌动蛋白特异性结合，影响着肌动蛋白单体-多聚体的平衡。

细胞松弛素 B (cytochalasin B)　细胞松弛素 B 是第一个用于研究细胞骨架的药物，它是真菌分泌的生物碱（图 10-39)。细胞松弛素 B 及其衍生物在细胞内同微丝的正端结合，并引起 F-肌动蛋白解聚，阻断亚基的进一步聚合。当将细胞松弛素加入到活细胞后，肌动蛋白纤维骨架消失，使动物细胞的各种活动瘫痪，包括细胞的移动、吞噬作用、胞质分裂等。它对微管没有作用，也不抑制肌收缩，因肌纤维中肌动蛋白丝是稳定的结构，不发生组装及解聚的动态平衡。

鬼笔环肽 (phalloidin)　一种毒性菇类中分离的剧毒生物碱，它同细胞松弛素的作用相反，它只与聚合的微丝结合，而不与肌动蛋白单体分子结合。它同聚合的微丝结合后，抑制了微丝的解体，因而破坏了微丝的聚合和解聚的动态平衡。用荧光标记的鬼笔环肽对细胞进行染色可以在荧光显微镜下观察微丝在细胞中的分布。

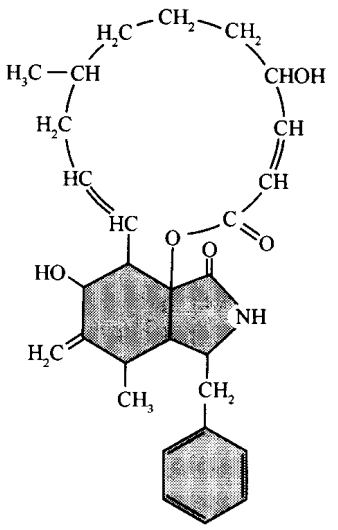


图 10-39　细胞松弛素 B 的结构

10.3.3 微丝结合蛋白

纯化的肌动蛋白在体外能够聚合形成肌动蛋白纤维，但是这种纤维不具有相互作用的能力，也不能行使某种功能。在显微镜下观察，它们只是杂乱无章地堆积而不像活细胞中肌动

蛋白纤维能够组织成各种结构，如束状、薄网状等。体外组装的肌动蛋白纤维本身同活体中的肌动蛋白纤维之间没有差别，只是组织结构不同。体内的肌动蛋白纤维是由不同的肌动蛋白纤维结合蛋白将肌动蛋白纤维组织成各种不同的结构，从而执行不同的功能。

10.3.3.1 微丝结合蛋白的种类

肌细胞和非肌细胞中都有微丝结合蛋白，至少已分离出 100 多种。表 10-3 是常见的几类主要的微丝结合蛋白。

表 10-3 几类主要的微丝结合蛋白

蛋白质	分子质量/kDa	来源
单体隔离蛋白		
抑制蛋白（profilin）	12～15	广泛分布
胸腺素（thymosin）	5	广泛分布
末端阻断蛋白		
β辅肌动蛋白（β-actinin）	35～37	肾、骨骼肌
CapZ	32，34	肌组织
加帽蛋白（capping protein）	28～31	*Acanthamoeba*
交联蛋白		
细丝蛋白（filamin）	250	平滑肌
肌动蛋白结合蛋白（ABP）	250	血小板，巨噬细胞
gelactin	23～28	变形虫
成束蛋白		
丝束蛋白（fimbrin）	68	小肠表皮
绒毛蛋白（villin）	95	肠表皮，卵巢
成束蛋白（fascin）	57	海胆卵
α辅肌动蛋白（α-actinnin）	95	肌组织
纤维切割蛋白		
凝溶胶蛋白（gelsolin）	90	哺乳动物细胞
片段化蛋白/割切蛋白（fragmin/severin）	42	阿米巴虫、海胆
短杆素（brevin）	93	血浆
肌动蛋白纤维去聚合蛋白		
cofilin	21	广泛分布
ADF	19	广泛分布
蚕食蛋白（depactin）	18	海胆卵
膜结合蛋白		
（肌）营养不良蛋白（dystrophin）	427	骨骼肌肉
黏着斑蛋白（vinculin）	130	广泛分布
膜桥蛋白（ponticulin）	17	*Dictyostelium*

10.3.3.2 微丝结合蛋白的功能

目前所发现的微丝结合蛋白的功能很多，但与肌动蛋白相互作用方式却十分简单（图 10-40）。应该注意的是，有些微丝结合蛋白具有多种功能。

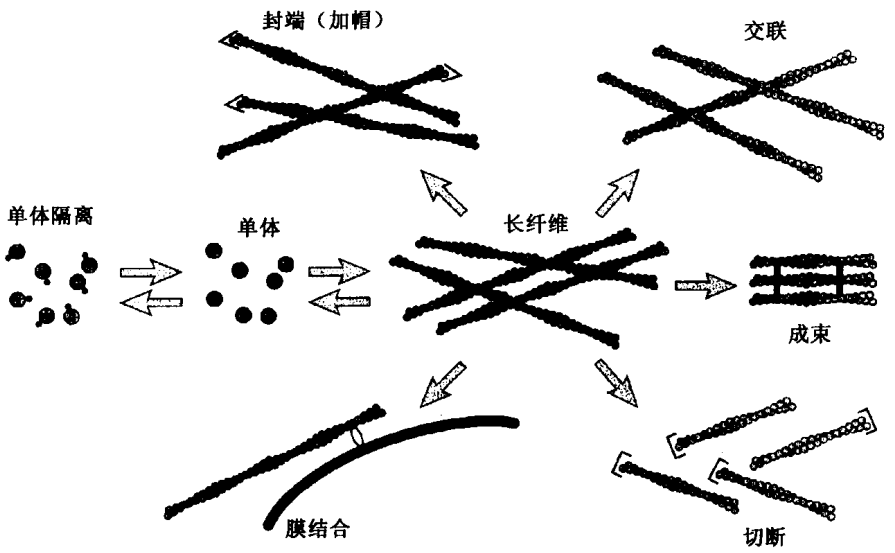


图 10-40　微丝结合蛋白的作用方式（引自 Karp，1999）

单体隔离蛋白（monomer-sequenstering protein）　抑制蛋白和胸腺嘧素能够同单体 G-肌动蛋白结合，并且抑制它们的聚合，将具有这种作用的蛋白质称为肌动蛋白单体隔离蛋白，这类蛋白质在非肌细胞中负责维持高浓度的单体肌动蛋白（200～500μm）。没有单体隔离蛋白，细胞质中可溶性的肌动蛋白几乎全部组装成肌动蛋白纤维。改变细胞质中单体隔离蛋白的浓度或改变它们的活性，就会使细胞质中肌动蛋白单体-聚合体的平衡发生变化，它们的活性和浓度决定着肌动蛋白是趋于聚合还是去聚合。

交联蛋白（cross-linking protein）　这类蛋白质的主要功能是改变细胞内肌动蛋白纤维的三维结构。每一种结合蛋白都有两个或两个以上同肌动蛋白结合的位点，这样，能够使两个或多个肌动蛋白纤维产生交联，使细胞内的肌动蛋白纤维形成网络结构。有些交联蛋白是杆状的，能够弯曲，由这种交联蛋白形成的网络结构具有相当的弹性，因而能够抵抗机械压力。有些交联蛋白是球状的，能够促使肌动蛋白成束排列，如微绒毛中的肌动蛋白束就是靠这种蛋白质交联的。

末端阻断蛋白（end blocking protein）　此类蛋白质通过同肌动蛋白纤维的一端或两端的结合调节肌动蛋白纤维的长度。加帽蛋白同肌动蛋白纤维的末端结合之后，相当于加上了一个帽子（图 10-41）。如果一个正在快速生长的肌动蛋白纤维在（+）端加上了帽子，那么在（-）端就会发生去聚合。某些加帽蛋白能够促使新的纤维形成（成核反应），同时抑制已存在微丝的生长，这样导致细胞内有大量较短的微丝存在。

纤维切割蛋白（filament-severing protein）　这类蛋白质能够同已经存在的肌动蛋白纤维结合并将它一分为二。由于这种蛋白质能够控制肌动蛋白丝的长度，因此大大降低细胞中的黏度。经这类蛋白质作用产生的新末端能够作为生长点，促使 G-肌动蛋白的装配。割断蛋白可作为加帽蛋白封住肌动蛋白纤维的末端。

肌动蛋白纤维去聚合蛋白（actin filament depolymerizing protein）　这类蛋白质主要存在于肌动蛋白丝骨架快速变化的部位，它们同肌动蛋白丝结合，并引起肌动蛋白丝的快速去

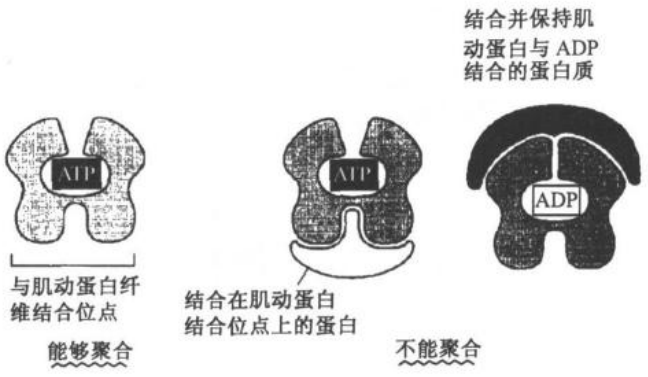


图 10-41　加帽蛋白的作用（引自 Alberts *et al*., 1998）

聚合形成 G-肌动蛋白单体。

膜结合蛋白（membrane-binding protein）　是非肌细胞质膜下方产生收缩的机器。在剧烈活动时，由收缩蛋白作用于质膜产生的力引起质膜向内或向外移动（如吞噬作用和胞质分裂）。这种运动由肌动蛋白纤维直接或间接与质膜相结合后形成的。直接的方式有同膜整合蛋白的结合，间接的方式有同外周蛋白的结合。两个典型的例子是红细胞膜骨架和细胞的整联蛋白连接（图 10-42）。这两种情况下，肌动蛋白丝通过膜结合蛋白与细胞质膜连接成一个网络结构。

除了上述介绍的几类肌动蛋白结合蛋白外，还有一种是发动机蛋白，以微丝作为运输轨道。

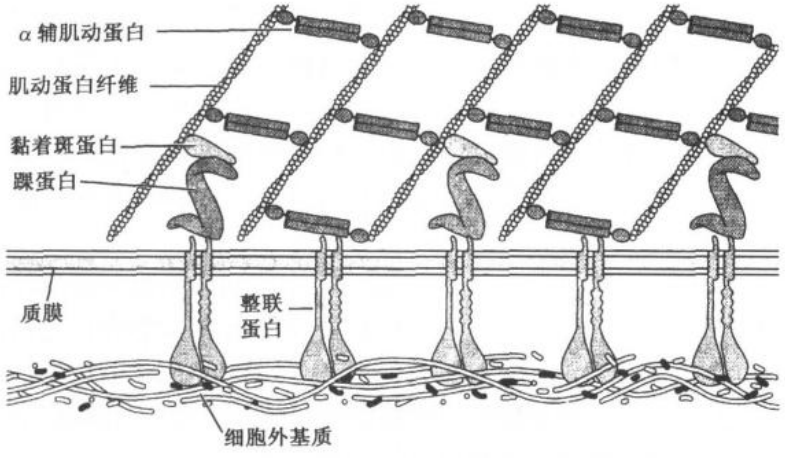


图 10-42　肌动蛋白纤维、微丝结合蛋白与整联蛋白的相互作用（引自 Cooper，2000）

10.3.3.3　肌球蛋白：肌动蛋白纤维的分子发动机

肌球蛋白是一种分子发动机，微丝是肌球蛋白运行的轨道。肌球蛋白也是 ATPase，通过 ATP 的水解导致构型的变化从而在肌动蛋白丝上移动。这种 ATPase 同微管分子发动机一样，

能够将化学能转变成机械能，所以又被称为机械化学酶（mechanochemival enzyme）。至今所研究的肌球蛋白在微丝上的移动方向都是从（－）端移向（＋）端，而 ATP 是发动机蛋白运动的能源。

肌球蛋白最早是从哺乳动物的骨骼肌组织中分离到的，其后在各种真核细胞，包括原生动物、高等植物、动物的非肌细胞、脊椎动物的心肌、平滑肌组织中都分离到肌球蛋白。

肌球蛋白的结构

通过基因克隆和 DNA 序列分析，已经鉴定了 10 多种肌球蛋白基因。肌球蛋白 I 和肌球蛋白 II 在肌球蛋白家族中是最丰富的，并且存在于几乎所有的真核生物的细胞中。正在研究的还有肌球蛋白 V，已经分离并初步研究了它的性质。

所有的肌球蛋白都是由一个重链和几个轻链组成，并组成 3 个结构和功能不同的结构域：头部结构域是最保守的结构域，它含有与肌动蛋白、ATP 结合的位点，负责产生力。与头部相邻的结构域是 α 螺旋颈区（α-helical neck region），它通过同钙调素或类似钙调素的调节轻链亚基的结合来调节头部的活性。尾部结构域含有决定尾部是同膜结合还是同其他的尾部结合的位点，因此它决定是否产生肌球蛋白二聚体还是产生肌球蛋白纤维（图 10-43）。

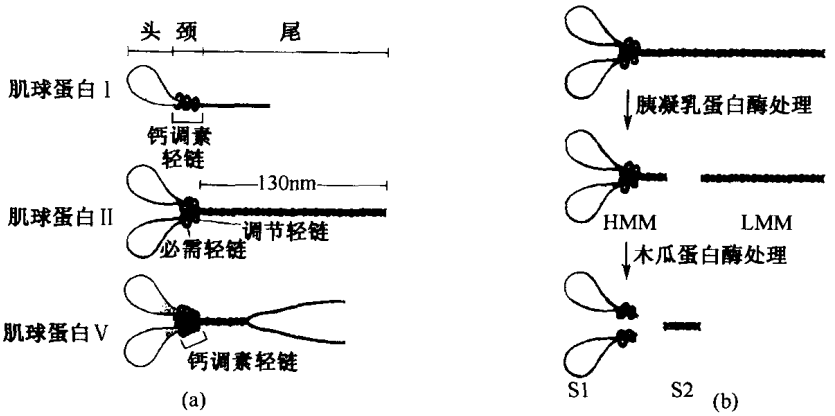


图 10-43　3 种类型的肌球蛋白的结构比较（引自 Lodish *et al*., 1999）

(a) 3 种肌球蛋白的形态结构，它们都有头、颈和尾 3 个结构域，每个结构域都具有不同的功能。头部结构域同肌动蛋白结合，并具有 ATPase 的活性。轻链同颈部结构域结合，对头部结构域起调节作用。尾部结构域是各种肌球蛋白特异功能的体现。(b) 肌球蛋白 II 的蛋白酶解揭示几种不同的结构域结构。大多数酶水解肌球蛋白 II，都会在颈部结构域切割产生一对头（HMM）和一个颈部片段（LMM）。再用木瓜蛋白酶水解，产生两个分开的头（S1）和一个颈部片段（S2）。

3 种类型的肌球蛋白在结构上既相似又有差异。肌球蛋白 II 和肌球蛋白 V 是二聚体，肌球蛋白 I 是单体蛋白，它同肌球蛋白 V 一样，含有同膜结合的尾。这 3 种肌球蛋白间的差异在于同颈部结合的轻链的数量和类型。肌球蛋白 I 和肌球蛋白 V 的轻链是钙调素，而肌球蛋白 II 含有两个不同的轻链，一个是必需轻链，另一个叫调节轻链。两种轻链都是类似于钙调素的钙结合蛋白，但是与钙结合的性质是不同的。肌球蛋白轻链的相似性说明所有的肌球蛋白都是通过钙这一相同的机制调节的。轻链的差异保证了不同的肌球蛋白在细胞钙信号的调节下行使不同的功能。

肌球蛋白 II 的分子质量为 500kDa，是一个长形而不对称的分子，长约 16nm，直径 2nm。电镜观察证明，肌球蛋白有两个球形头部和一个长的杆部。肌球蛋白 II 含有两条相同的长肽链和 4 条短肽链，长肽链的分子质量为 200kDa，称为重链，短肽链称为轻链。

如果用胰凝乳蛋白酶（chymotrypsin）处理肌球蛋白 II，在尾部中间可使肌球蛋白断裂，产生两个片段，带有头部的片段称为重酶解肌球蛋白（heavy meromyosin，HMM），尾部的片段称为轻酶解肌球蛋白（light meromyosin，LMM）。如果用木瓜蛋白酶（papain）进一步处理 HMM，则从头部分离产生两个碎片，分别称为 S1 和 S2。

肌球蛋白的功能

通过遗传分析和突变的研究，已经了解到这 3 种肌球蛋白的功能完全不同，但是它们具有分子发动机这一基本相同的作用：肌球蛋白 II 为肌肉收缩和胞质分裂提供力，而肌球蛋白 I 和 V 则涉及细胞骨架与膜之间的相互作用，如膜泡的运输。

所有肌球蛋白的头都能在肌动蛋白上行使力的作用，但是对于不同种类的肌球蛋白的特殊功能则是由它们的尾部来决定。例如肌球蛋白 I、肌球蛋白 V 的作用与膜有关，因为它们的尾部能够同质膜或细胞内细胞器的膜结合（图 10-44a）。由于它们具有膜结合的活性，推测它们能够以微丝为轨道运输小泡。

与肌球蛋白 I 的膜结合活性相反，两个肌球蛋白 II 能够通过杆状尾部聚合在一起，形成寡聚的肌球蛋白纤维，这种纤维具有双极性，头部位于两端，中间有一个裸露的带（图 10-44b），这种结构参与肌收缩。

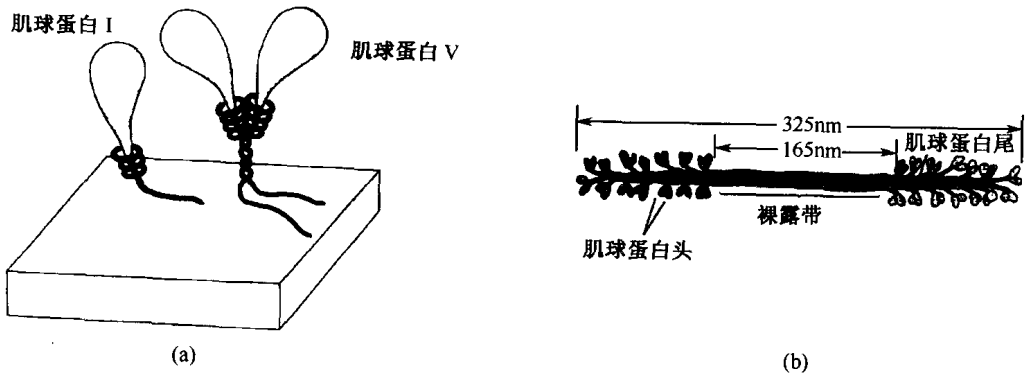


图 10-44　肌球蛋白尾部结构域的功能（引自 Lodish *et al*., 1999）
(a) 肌球蛋白 I 和肌球蛋白 V 可用尾部的不定位点与膜结合，起运输作用；(b) 肌球蛋白 II 的螺旋状的尾部能够聚合形成粗肌丝。

实际上，肌球蛋白是一种特别的酶，一种能够同运动偶联起来的 ATPase。肌球蛋白 ATPase 的活性有一个特别的特性就是受肌动蛋白激活。在没有肌动蛋白时，溶液中的肌球蛋白也能够将 ATP 水解成 ADP 和 P_i，但是速度很慢，每小时只能水解 4 个 ATP。然而在肌动蛋白和肌球蛋白复合体中，肌球蛋白 ATPase 的活性在受到刺激时，可高达每秒钟水解 20 个 ATP，先决条件就是肌球蛋白的头必须同肌动蛋白结合。

体外实验证明了肌球蛋白的头能够沿着肌动蛋白纤维行走，这同证明驱动蛋白在微管上行走的方法一样。同时测定到肌球蛋白在微丝上行走时，每一步的跨度为 11～15nm。

肌球蛋白的运动机制

肌球蛋白是怎样将从 ATP 获得的能量同产生运动的力偶联起来？已经了解，所有肌球蛋白的头都能在肌动蛋白纤维上行走，尽管它们的尾部结合点是不同的，这就说明，所有的肌球蛋白运动的机制是相同的。目前较为公认的是滑动模型，认为单个 ATP 分子的水解同肌球蛋白运动的一次循环相偶联。该模型的核心是肌球蛋白的头部随着 ATP 的结合和水解不断产生构型的变化，从而引起在微丝上的移动。每一循环包含 4 个基本步骤（图 10-45）。

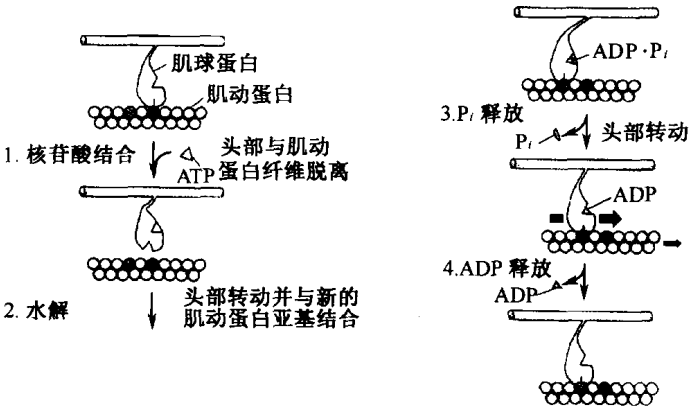


图 10-45　ATP 水解与肌球蛋白沿肌动蛋白丝移动偶联模型（引自 Lodish *et al*., 1999）

第一步，肌球蛋白的头是同肌动蛋白结合在一起的，其 ATP 结合位点闲置，留下一个空隙，此时一个 ATP 分子同头部闲置的 ATP 结合位点结合，由于 ATP 的结合。使肌球蛋白头部构型发生变化，导致肌球蛋白的头部同肌动蛋白脱离。

第二步，肌球蛋白的头同肌动蛋白脱离之后，ATP 被水解产生 ADP 和 P_i，引起肌球蛋白的头部弯曲，在这种新构型下，肌球蛋白的头部同肌动蛋白纤维的另一个亚基结合。

第三步，当肌球蛋白头部与肌动蛋白新亚基结合后，释放出 P_i，由于 P_i 的释放使肌球蛋白的头部构型发生变化，并产生滑动的力。

第四步，ADP 从肌球蛋白的结合位点释放出来，肌球蛋白的头部构型恢复到原始状态，循环结束。

在滑动模型中，肌球蛋白沿着肌动蛋白纤维行走。然而，行走所产生的结果要根据肌球蛋白或肌动蛋白是如何锚定而定。例如，在双极性的肌球蛋白纤维中，肌球蛋白的头部是紧紧锚定在粗纤维骨架上的，由于粗纤维的两端都有头部，运动的结果引起肌动蛋白纤维向中间移动，这就产生收缩。如果是一个肌球蛋白 I 分子，它的尾部同膜运输小泡结合，肌球蛋白同肌动蛋白之间的作用引起的移动正是对小泡的运输。

10.3.4　肌细胞：特化的肌收缩功能

多细胞生物有机体的一切机械运动及各脏器的重要生理功能，例如肢体的运动、心脏的跳动、血管的舒缩、肠胃的蠕动、肺的呼吸以及泌尿生殖的过程都要通过肌收缩与松弛才能

实现。使肌收缩所需要的能是由 ATP 水解提供的。在脊椎动物中，氧化磷酸化产生的 ATP，几乎有 1/3 用于肌收缩。

肌细胞在进化的过程中形成了一种高度特化的功能：肌收缩（muscle contraction）。在肌细胞中，肌动蛋白和肌球蛋白联合形成一种复合物：称为肌动球蛋白（actomyosin），一种高度有序的结构，并能高效地工作。

10.3.4.1 骨骼肌细胞的基本结构

骨骼肌（skeletal muscle）是由一束肌细胞，或称为肌纤维（myofiber）所组成。典型的肌细胞是圆柱形的长细胞（长度可达 40mm，宽为 10～100μm），并且含有许多核（可多达 100 个核）。

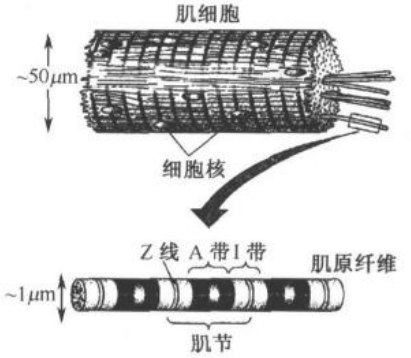


图 10-46 肌细胞的结构

每个肌纤维被一层细胞质膜包被，这种细胞膜称作肌膜（sarcolemma）。扁平的细胞核位于肌膜的下方，并沿细胞的长度多点分布。在肌细胞的细胞质中有成束的肌原纤维（myofibril）。在光学显微镜下观察，肌原纤维的直径为 1～2μm，与肌长轴相平行，有明暗相间的带，明带称为 I 带（I band），宽 0.8μm；暗带称为 A 带（A band），宽 1.5μm。所谓 I 带和 A 带是指：在偏光镜观察时，I 带表示单折光带（isotropic band），而 A 带表示双折光带（anisotropic band）。在 I 带中有一条着色较深的线，叫 Z 线。Z 线将肌原纤维分成一系列的重复单位——肌节（sarcomere），每一个肌节的长度约 2μm（图 10-46）。

10.3.4.2 肌原纤维的结构

在电子显微镜下揭示肌原纤维是由两种类型的长纤维构成，一种是细肌丝（thin filament），直径为 6nm；另一种是粗肌丝（thick filament），直径为 15nm。明带只含有细肌丝，所以比较亮，而暗带之所以暗，是因为有粗肌丝和细肌丝的重叠。粗肌丝的长度占据整个 A 带，而细肌丝没有伸展到 A 带的中央区，所以 A 带的中央区也比较明亮，该区叫 H 带，H 带的中线叫 M 线（图 10-47）。

粗肌丝 用盐抽提骨骼肌，除去粗肌丝之后，引起 A 带的消失，但是细肌丝和 I 带仍然存在；生化分析揭示被除去的是肌球蛋白而不是肌动蛋白，说明肌球蛋白是粗肌丝的主要结构成分。由于构成粗肌丝的肌球蛋白是首尾排列的，所以粗肌丝是双极性的。头部露在外部，成为与细肌丝接触的桥，头部激活后有 ATP 酶的活性，引起肌收缩。估计每个粗肌丝由几百个（250～300）肌球蛋白构成。

细肌丝 肌节中的 I 带是细肌丝，在同一个 I 带中的所有细肌丝的长度都相等，但是不同的肌细胞中可能不相同。生化分析表明细肌丝由三种蛋白质组成，主要成分是肌动蛋白，它约占肌原纤维的总蛋白的 25%。电子显微镜检查发现所有细肌丝的极性相同，一端与 Z 线相连，另一端靠近肌节的中心，（+）端靠近 Z 线。另两种蛋白是原肌球蛋白和肌钙蛋白。

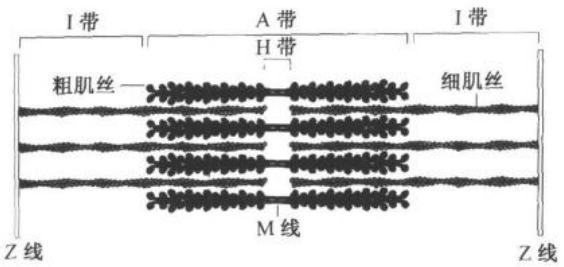


图 10-47　肌原纤维的结构（引自 Karp，1996）

细肌丝的两端分别与两个不同的肌动蛋白加帽蛋白结合（图 10-48），一个是 CapZ 蛋白，另一个是原肌球调节蛋白（tropomodulin）。

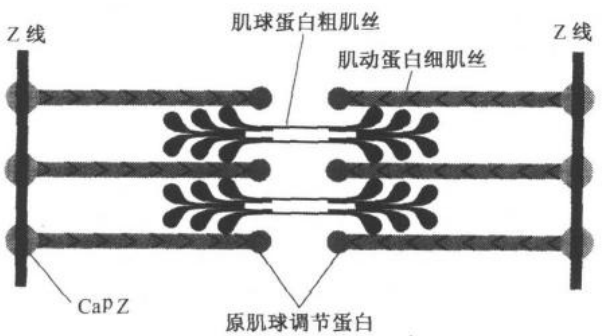


图 10-48　肌节中与细肌丝结合的加帽蛋白的结合部位和作用（引自 Lodish *et al*.，1999）
CapZ 蛋白结合在肌动蛋白的（+）端，位于 Z 线。原肌球调节蛋白结合在肌动蛋白的（-）端。这两种蛋白的结合有利于细肌丝的稳定，防止去聚合。

Z 线（Z disk）　是纤维网状结构，它们的主要功能是锚定肌动蛋白纤丝的（+）端。至于肌动蛋白纤丝是如何同 Z 线结合的，尚不清楚，推测 CapZ 蛋白和 α 辅肌动蛋白（α-actinin）都有作用。α 辅肌动蛋白是 Z 线提取物中的主要成分，它很可能在 I 带中将细肌丝交联成束。

原肌球蛋白（tropomyosin，Tm）　是细肌丝中肌动蛋白的结合蛋白，它的分子质量为 2×35kDa，长为 41nm，由两条平行的多肽链组成 α 螺旋构型，每条原肌球蛋白首尾相接形成一条连续的链同肌动蛋白细肌丝结合，正好位于双螺旋的沟（groove）中。每一条 Tm 含有 7 个肌动蛋白结合位点，因此可同肌动蛋白细肌丝中 7 个肌动蛋白亚基结合（图 10-49a 和 10-49b）。

肌钙蛋白（troponin，Tn）　是由 3 个多

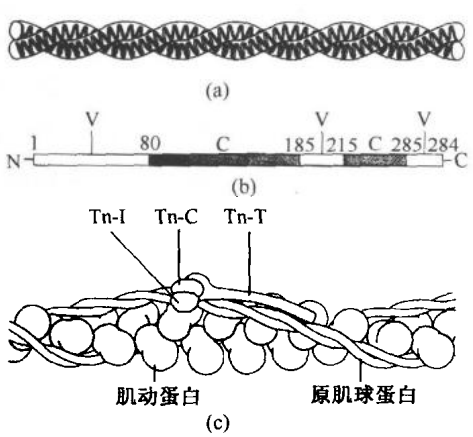


图 10-49　原肌球蛋白及其结合蛋白
（引自 Wolfe，1993）
(a)Tm 的螺旋结构；(b)Tm 的序列特征，C 是保守区，V 是可变区，不同来源的 Tm 的 V 区序列可能不同；非肌细胞中的 Tm 的长度要短些，但保守区的组成相同；(c)Tm、Tn 和肌动蛋白的结合关系。

肽，即肌钙蛋白 T（Tn-T）、肌钙蛋白 I（Tn-I）、肌钙蛋白 C（Tn-C）组成的复合物（图 10-49c），分子质量的 80 kDa。Tn-T 是一种长形的纤维状分子，长度大约是原肌球蛋白的 1/3，Tn-I 和 Tn-C 都是球形分子。Tn-I 能够同肌动蛋白以及 Tn-T 结合，它同肌动蛋白的结合就抑制了肌球蛋白与肌动蛋白的结合。Tn-C 是肌钙蛋白的 Ca^{2+} 结合亚基，在序列上同钙调蛋白以及肌球蛋白的轻链相类似，Tn-C 控制着原肌球蛋白在肌动蛋白纤维表面的位置。在细肌丝上大约每隔 40nm 就结合有一个肌钙蛋白。

肌联蛋白（titin）与伴肌动蛋白（nebulin）　在肌节中除了上述的蛋白质成分外，还有两种重要的蛋白质：肌联蛋白和伴肌动蛋白（图 10-50）。

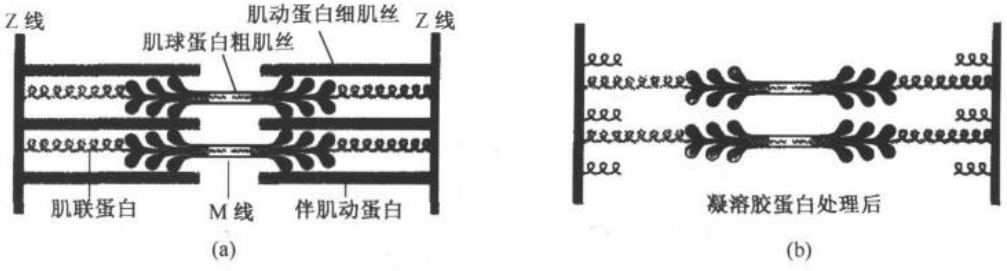


图 10-50　肌联蛋白-伴肌动蛋白纤维系统对粗肌丝和细肌丝的稳定作用（引自 Lodish *et al*.，1999）
(a) 每条粗肌丝都有肌联蛋白纤维维持它的稳定，跨度起自 Z 线到 M 线；每条细肌丝的（+）端到（-）端都结合有伴肌动蛋白纤维；(b) 用凝溶胶蛋白（gelsolin）处理肌细胞，破坏了肌节中的细肌丝，没有了肌动蛋白的支持，伴肌动蛋白凝缩在 Z 线。

肌联蛋白是骨骼肌纤维中的第三类丰富蛋白质，是巨型分子，分子质量为 2 700 kDa（25 000 多个氨基酸），长度为 1μm，约占肌节的一半。肌联蛋白源自 M 线，并沿肌球蛋白纤维伸展，通过肌节的 A 带，最后到达 Z 线。肌联蛋白是高度弹性的分子（伸展时比原长度多出 3μm），因此在肌收缩和舒张时保持肌球蛋白纤维位于肌节的中心。

伴肌动蛋白是存在于肌节中的另一种大的蛋白质，分子质量为 700kDa。伴肌动蛋白形成长的非弹性纤维，具有多个重复的肌动蛋白结合结构域，并且从 Z 线开始，沿细肌丝向中心区伸展。每个伴肌动蛋白纤维的长度与相邻的肌动蛋白长度相等，因此推测，伴肌动蛋白纤维相当于一把分子尺，调节肌纤维成熟时肌动蛋白单体装配成细肌丝的长度。用肌动蛋白切断蛋白处理肌细胞，证实了伴肌动蛋白的存在。

10.3.4.3　肌收缩的滑动丝模型及分子基础

关于肌动蛋白和肌球蛋白是怎样相互作用引起肌收缩问题的研究，在 20 世纪 50 年代初取得了关键性的突破。当时有几个实验室各自独立地对肌收缩进行了分析并得到收缩的不同阶段骨骼肌所显示的带型。他们的测量结果表明：在肌收缩过程中，肌节几乎缩短 50%，但是肌节的 A 带的长度并没有发生变化。肌节的缩短只是伴随着 I 带的缩短，在整个收缩的肌纤维中，I 带几乎消失了。

根据这些观察，两个英国研究小组的科学家们提出了一个大胆的模型解释肌收缩的机制。他们推测：肌节的缩短并不是因纤丝的缩短而引起，而是由纤丝互相滑动所致。细肌丝向肌节中央滑动，肌丝滑进了 A 带之中导致重叠部分增加，使得 I 带和 H 带的宽度缩小，其结果

是缩短了肌节，减少了肌纤维的长度（图 10-51），这就是肌收缩的滑动丝模型（sliding filament model）。这一模型很快被接受，并不断完善。

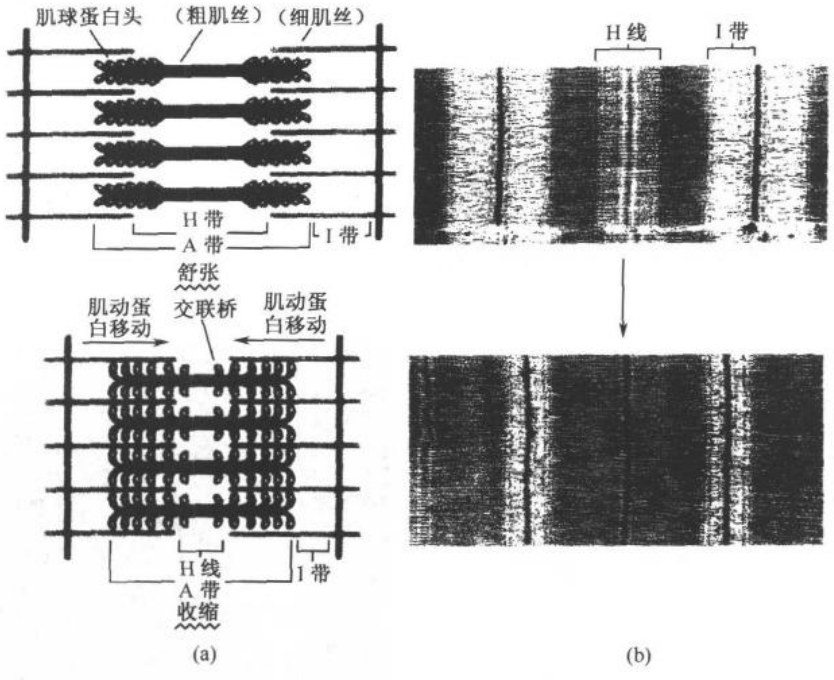


图 10-51　肌收缩时肌节的收缩（引自 Karp，1999）

(a) 肌收缩时肌节长度变化及肌节结构差异示意图。在肌收缩时，肌球蛋白的交联桥与周围的细肌丝接触，细肌丝被推动滑向肌节的中心；(b) 肌收缩时的电子显微镜照片。

按照前面讨论的肌球蛋白 II 的工作原理，粗肌丝同细肌丝之间的滑动必然要涉及粗肌丝中肌球蛋白 II 的头部同肌动蛋白细肌丝接触，产生细肌丝与粗肌丝之间的交联桥（cross bridge），才能产生滑动。纤丝滑动模型提出之后，科学家的注意力很快转移到肌球蛋白，并研究肌球蛋白的头是如何作为肌纤维中产生力的成分起作用。很快发现在收缩时，每个肌球蛋白的头都向外伸出，并与细肌丝紧紧地结合，形成细肌丝与粗肌丝间的交联桥。每一条肌球蛋白丝的头能够同周围 6 条肌动蛋白纤维相互作用。一旦同细肌丝结合，肌球蛋白的头部就会快速向中心部位弯曲。使细肌丝沿粗肌丝向肌节中央移动 5～15nm。1993 年 Rayment 等提出旋转升降臂（swinging lever arm）假说，解释肌球蛋白与肌动蛋白之间的滑动的机理（图 10-52）：ATP 水解释放出的能量诱导肌球蛋白头部构型发生少许改变，然后通过旋转使肌球蛋白 α 螺旋的颈部伸展。按照这一假说，肌球蛋白的颈部作为强度极高的升降臂（lever arm），引起肌动蛋白纤维快速的远距离滑动。而结合在颈部的两条轻链则对升降臂起加固作用。旋转升降臂假说得到很多实验的支持。

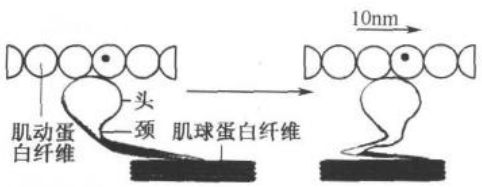


图 10-52　肌球蛋白颈部作为旋转升降臂开关的模型（引自 Karp，1999）

10.3.4.4 Ca^{2+}在肌收缩中的作用

按照滑动的模型，粗肌丝同细肌丝之间的滑动需要肌球蛋白的头部同肌动蛋白细肌丝接触，产生细肌丝与粗肌丝之间的交联桥。

Ca^{2+}对肌收缩的调节作用

由于细肌丝的肌动蛋白上结合有两种蛋白质，其中的原肌球蛋白能够同 7 个肌动蛋白单体结合，并封闭了肌动蛋白上同肌球蛋白结合的位点。在这种情况下，肌节中的粗肌丝和细肌丝之间不可能形成交联桥，因为肌动蛋白上同肌球蛋白头部结合的位点被原肌球蛋白封闭了。只有解除原肌球蛋白对肌动蛋白纤维的抑制，才有可能形成交联桥（图 10-53）。

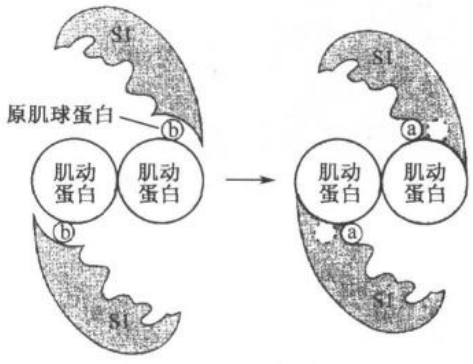


图 10-53　原肌球蛋白在肌收缩中的作用
（引自 Karp，1999）
当原肌球蛋白处于 b 位时，抑制了肌球蛋白头部与肌动蛋白的结合，当原肌球蛋白移动到 a 位时，解除抑制的肌球蛋白头部得以同肌动蛋白接触。

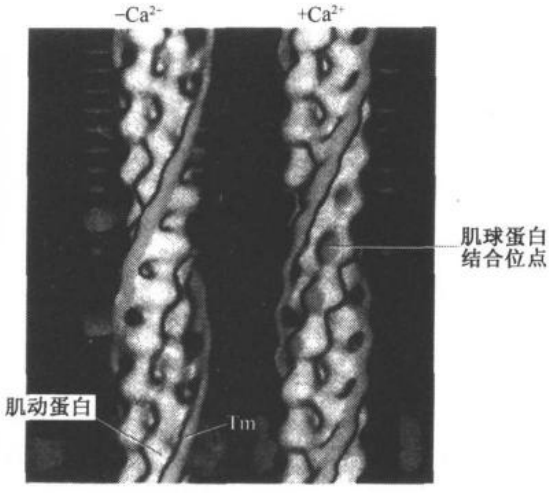


图 10-54　Ca^{2+}对原肌球蛋白与肌动蛋白结合的影响
（引自 Karp，1999）
当 Ca^{2+}很低时，肌动蛋白上与肌球蛋白结合的位点被原肌球蛋白占据，Ca^{2+}浓度高时，通过与肌钙蛋白 Tn-C 亚基的结合，改变原肌球蛋白在肌动蛋白纤维中的结合部位，暴露出与肌球蛋白结合的位点。

细胞中 Ca^{2+}浓度能够调节原肌球蛋白对肌动蛋白的抑制作用，因为高浓度的 Ca^{2+}能够同肌钙蛋白的 Tn-C 亚基结合，改变原肌球蛋白同肌动蛋白结合的位置，解除原肌球蛋白对肌动蛋白的抑制，露出与肌球蛋白头部结合的位点（图 10-54）。

Ca^{2+}浓度调节：肌收缩与神经兴奋相偶联

如同其他一些细胞活动，肌收缩也是由胞质溶胶中 Ca^{2+}浓度的升高所引起。在正常情况下，Ca^{2+}在胞质溶胶中的浓度很低，在 0.1μmol/L 以下。非肌细胞靠细胞质膜中的 Ca^{2+}-ATPase维持胞质溶胶中 Ca^{2+}的低浓度，它可将胞质溶胶中的 Ca^{2+}泵到细胞外。而肌细胞维持胞质溶胶中低 Ca^{2+}浓度则是依靠肌质网（sarcoplasmic reticulum，SR）中的 Ca^{2+}-ATPase的作用，它将胞质溶胶中的 Ca^{2+}不断输入肌质网中。肌质网是肌细胞中的管状网络结构，它是肌细胞中的 Ca^{2+}库。

在骨骼肌细胞中，Ca^{2+}浓度的变化受运动神经信号调节，也就是说，肌收缩受神经控制，这种控制是通过细胞内信号Ca^{2+}来传递的。当神经冲动到达骨骼肌细胞时，引起细胞质膜膜电位的变化（去极化）。骨骼肌细胞能够将这种电信号（去极化）很快转变成胞质溶胶中的化学信号，即提高胞质溶胶中的Ca^{2+}浓度，由Ca^{2+}启动肌收缩。这条信号途径的一个结构上的特点就是要通过细胞质膜向胞质溶胶内陷所形成的横小管（transverse tubule，T管），而T管的末端靠近肌质网（图10-55a）。这样，神经信号最后是通过T管传到肌质网。

由此可以推测，神经系统的电信号传递是以膜电位的形式沿着神经细胞传递的，这种膜电位叫动作电位（action potential）。当动作电位到达神经细胞末梢时，它触发神经递质扩散，穿过轴突，并同相邻靶细胞的质膜结合，使细胞质膜去极化，最后信号通过与肌质网相邻的T管激发肌质网向胞质溶胶释放储存的Ca^{2+}，从而使胞质溶胶中的Ca^{2+}浓度快速升高，使电信号转变成化学信号（图10-55b）。

释放出来的Ca^{2+}同肌钙蛋白结合，解除原肌球蛋白对肌动蛋白的抑制，使粗肌丝肌球蛋白的头部得以同肌动蛋白接触，形成交联桥。然后再由ATP同肌球蛋白头部的ATP结合位点结合，并通过ATP的水解提供能量以及肌球蛋白头部构型的变化，引起粗肌丝与细肌丝间的滑动，产生肌的收缩。

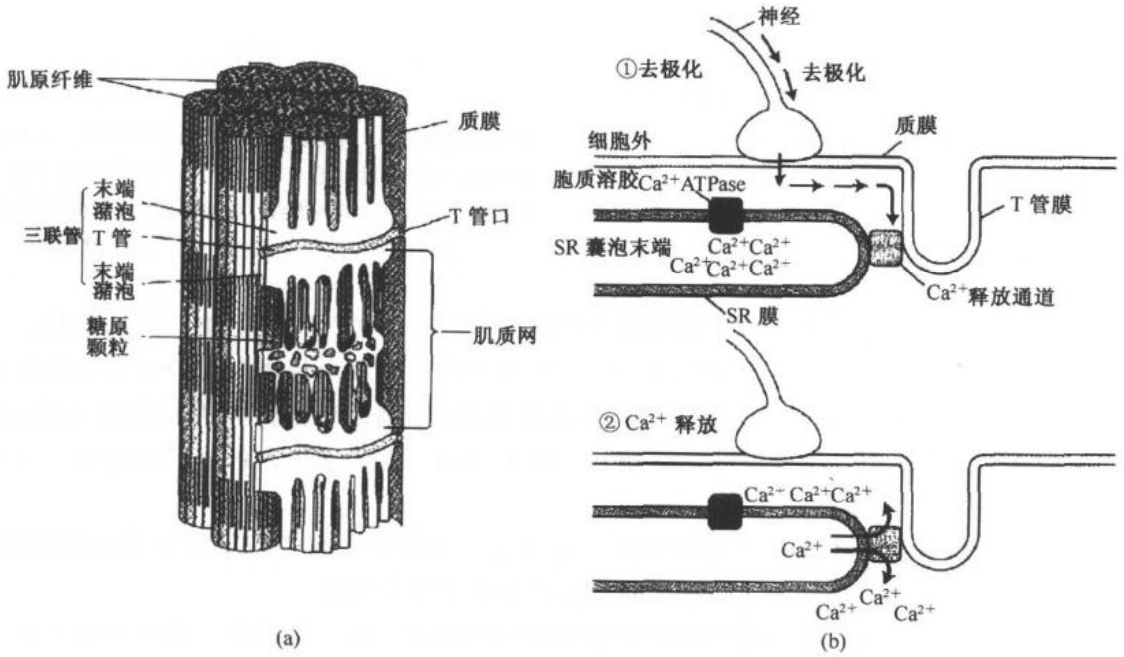


图10-55　肌质网对骨骼肌胞质溶胶中Ca^{2+}浓度的调节作用（改自Kleinsmith *et al*., 1995）
(a) 肌纤维的三维结构图；(b) SR释放Ca^{2+}；①神经信号传递到肌纤维的细胞质膜，经T管靠近肌质网；②诱导肌质网释放Ca^{2+}，使胞质溶胶中Ca^{2+}浓度升高。

10.3.5　肌动蛋白和肌球蛋白在非肌细胞中的作用

根据肌动蛋白和肌球蛋白在肌收缩中的作用，科学家们相信，非肌细胞中的许多运动都与肌动蛋白和肌球蛋白有关，包括胞质分裂、胞质环流、吞噬作用、细胞形态变化、膜泡运

输、细胞黏着与连接等。

10.3.5.1 黏着斑和微绒毛中的束状肌动蛋白纤维

当将细胞放在培养瓶中进行培养时，细胞需要同培养瓶底接触，并平铺在基底生长，这种结合通常需要形成一种特殊的紧密的黏着斑。在黏着斑的细胞质膜的下方有肌动蛋白成束状排列，这种结构叫应力纤维（stree fiber）。

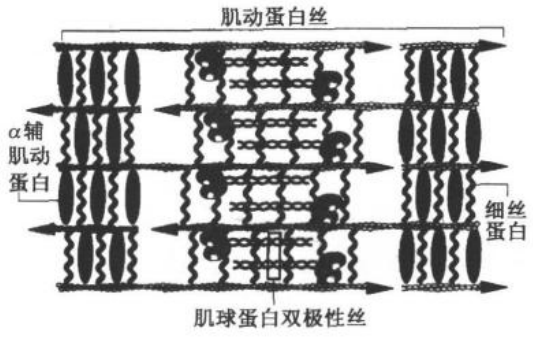


图 10-56 应力纤维的结构组成（引自 Karp，1999）
肌动蛋白呈反向平行，其他 3 种蛋白以各自的方式排列，将微丝装配成束状应力纤维。

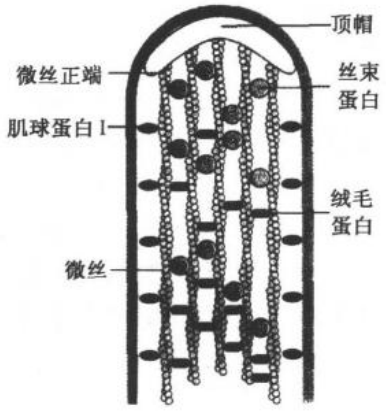


图 10-57 微绒毛中的肌动蛋白束及其相关蛋白（引自 Karp，1999）
微绒毛常存在于具有物质吸收功能的组织表面，如小肠和肾小管。每一个微绒毛含有大约 25 个肌动蛋白纤维，并结合有绒毛蛋白和毛绿蛋白。肌球蛋白 I 位于微绒毛的肌动蛋白束和细胞质膜之间，功能尚不清楚。

应力纤维又叫张力纤维，是真核细胞中广泛存在的一种较为稳定的束状纤维结构，与骨骼肌中肌原纤维非常相像。应力纤维由大量平行排列的肌动蛋白组成，此外还含有其他在肌细胞鉴定过的蛋白质，包括肌球蛋白 II、原肌球蛋白、α 辅肌动蛋白和细丝蛋白（filamin），这些蛋白质在肌动蛋白纤维上呈非连续排列（图 10-56），但肌动蛋白纤维是连续的，并成双向定向。

应力纤维具有收缩功能，它在细胞的形态发生、细胞分化和组织形成中具有重要作用。由整联蛋白介导的细胞外基质同细胞内的连接也是通过应力纤维。

微绒毛（microvilli）是一些动物细胞表面的指状突起，每一微绒毛（指状凸起）由一束纤维状肌动蛋白稳定，其中含有绒毛蛋白（villi）和毛绿蛋白（fimbrin），不含肌球蛋白 II、原肌球蛋白和 α 辅基蛋白，因而无收缩作用。

一个肠细胞表面有几千个微绒毛，它们的存在大大增加了肠上皮表面积，有利于吸收营养物质。微绒毛的长度为 1～3μm，直径为 0.1μm，由几十个成束平行排列的肌动蛋白纤维支持并定向。微绒毛中肌动蛋白纤维的排列方向相同，（+）端指向微绒毛的尖端(图 10-57)。

10.3.5.2 细胞内运输作用

微丝同微管一样，在细胞内可以作为分子发动机进行物质运输的轨道，例如小泡的运输，

可通过肌球蛋白 I 同微丝结合，将小泡沿微丝的（－）端向（＋）端移动。另外，肌球蛋白 I 的尾部同质膜结合，利用其头部可将微丝从一个部位运向另一个部位（图 10-58）。

10.3.5.3 胞质环流

胞质环流（cytoplasmic streamting，cyclosis）是菌类、藻类和高等植物细胞中非常活跃的运动现象。在植物细胞中，细胞质的流动是围绕中央液泡进行的环形流动模式，这种流动称为胞质环流。在胞质环流中，细胞周质区（cortical region）的细胞质是相当稳定的不流动的，只是靠内层部分的胞质溶胶在流动。在能流动和不流动的细胞质层面有大量的微丝平行排列，同叶绿体锚定在一起。胞质环流是由肌动蛋白和肌球蛋白相互作用引起的。在胞质环流中，肌动蛋白的排列方向是相同的，正向朝向流动的方向，肌球蛋白可能是沿着肌动蛋白纤维的（－）端向（＋）端快速移动，引起细胞质的流动。胞质环流对于细胞的营养代谢具有重要作用，能够不断地分配各种营养物和代谢物，使它们在细胞内均匀分布（图 10-59）。

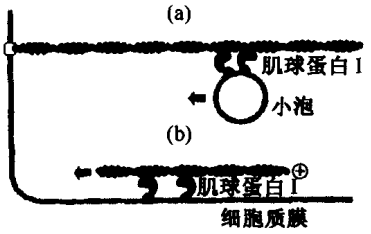


图 10-58 肌球蛋白的功能（引自 Alberts *et al*., 1998）
(a) 运输膜泡；(b) 运输微丝。

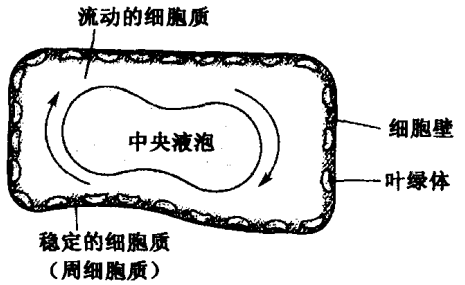


图 10-59 植物细胞的胞质环流（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）
典型的胞质环流。在此过程中，细胞质环绕中央液泡流动。

10.3.5.4 细胞运动

动物细胞从一个位置向另一个位置移动靠两种机制：一种是依靠运动器官：鞭毛和纤毛，这种机制实际上是在液体中的泳动。另一种机制就是靠细胞质的流动使细胞产生移动，这种方式是在固体支持物上进行的。最早研究的细胞移动是变形虫，开始称为变形运动（amoeboid movement），后来称为细胞爬行（cell crawling）。除了变形虫和相关的单细胞真核生物具有细胞运动外，某些血细胞、胚胎细胞、成纤维细胞、癌细胞和培养的细胞都有运动现象。

变形运动——单细胞的移动

原生动物中的变形虫，高等动物中的巨噬细胞和白细胞等没有鞭毛、纤毛等运动器官，但能够依靠细胞体的变化进行移动，叫变形运动。通常要靠胞质环流形成伪足（pseudopodia），细胞沿着伪足形成的方向前进。细胞内流动的细胞质叫内质（endoplasm），从尾部流向前进中的伪足。当液流到达伪足时，流动的细胞质分向细胞的两侧，并形成较硬的外质（ectoplasm）。其间，位于细胞后部的外质被破坏并向前方提供新的内质，由此产生内质和外质的循环转变，并引起细胞向前移动（图 10-60）。细胞质由坚硬的凝质状态（外质）向可流动的液态（内质）转变的过程称为凝胶-溶胶（gel-sol）转变。相反的过程叫溶胶-凝胶（sol-gel）

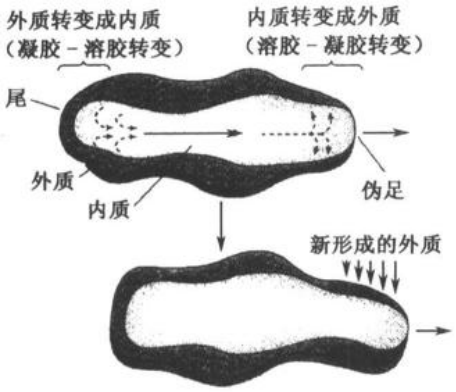


图 10-60　胞质环流与细胞运动（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

内质从尾部流向形成伪足的前方，在伪足处经过 sol-gel 转变，使内质转变成外质期间。细胞前缘的外质经过 gel-sol 转变成新的内质。由此驱使细胞前移。

转变。

在变形运动中，肌动蛋白起了重要作用。实际上，sol-gel，gel-sol 的相互转变是肌动蛋白纤维单体和聚合体的相互转变，单体是可溶的，而纤维是较硬的，流动性自然差。

细胞爬行

高等脊椎动物中的细胞移动是很多活动所必需的，如伤口的愈合、防止感染、血块凝集等。但是，体内细胞的移动是难以观察的，所以科学家只能用培养的动物细胞研究多细胞动物体内细胞的移动。

多细胞动物的细胞移动与单细胞生物的移动过程相比，除了所涉及的肌动蛋白分子的变化特性基本相似外，有很大的差别。在培养的动物细胞中，细胞爬行可以分为三个过程（图 10-61）：首先是细胞前缘的扩展（extension），这一步是由肌动蛋白的聚合作用引起的；第二步是扩展的前缘通过黏着斑的形成附着到附着层(substratum)；第三是通过胞质溶胶向前流动和细胞尾部的收缩将细胞向前推进，在细胞质收缩过程中，肌动蛋白纤维切割蛋白可能起了重要作用。

在起始阶段，细胞前缘的伸展需要形成暂时性的表面结构，在爬行的成纤维细胞中形成扁平的片状伪足（lamellipodia），而在其他类型的细胞中，伸展形成的伪足有长而细、短而粗、或圆柱状等。尽管形态不同，伪足中都充满着肌动蛋白纤维。如果用细胞松弛素处理细

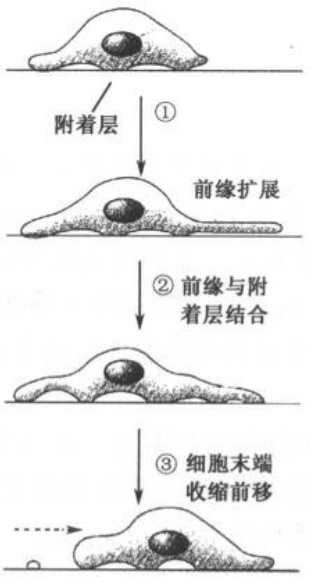


图 10-61　培养的动物细胞爬行的 3 个过程示意图（引自 Alberts *et al*., 1998）

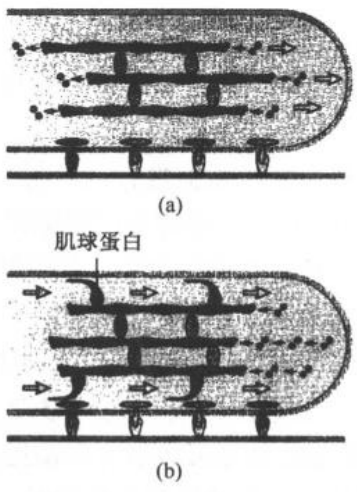


图 10-62　细胞运动中力产生的两种假说（引自 Karp, 1999）

(a) 微丝装配假说；(b) 滑动假说。

胞，前缘的伸展就不会发生。

细胞爬行的第二步，细胞伸展的部分必须同附着层紧密结合，这是通过形成黏着斑实现的。黏着斑的形成不仅将细胞与基质固定，同时也确定了细胞爬行的方向。黏着斑大约长1～2μm，宽0.5μm。黏着斑的形成也与肌动蛋白纤维相关。

细胞爬行的第三步胞质溶胶的流动与细胞尾部的收缩涉及肌动蛋白纤维的去聚合。这一过程可能与Ca^{2+}浓度有关。

细胞运动过程中力产生的机制

细胞运动中力的产生有两种假说（图10-62）：一种是通过微丝的装配将质膜向前推进；另一种假说认为力的产生是由肌球蛋白和肌动蛋白相互滑动的结果。

第一种假说认为肌动蛋白亚基从微丝的周质一端添加到肌动蛋白纤维中，这样迫使细胞向前伸展。按照第二种假说，细胞的伸展是通过肌球蛋白与相邻周质肌动蛋白纤维相互滑动将细胞向前推进，而靠近细胞质中间部分的肌动蛋白纤维则不能同肌球蛋白接触。这两种假说对于肌动蛋白的作用是肯定的，但是对于肌球蛋白来说，却不能肯定。

为了检查肌球蛋白在细胞运动中的作用，用荧光标记的抗不同肌球蛋白的抗体注射运动的细胞。结果表明，肌球蛋白I集中于运动细胞的前部，而肌球蛋白II集中于运动细胞的尾部。根据这一结果，推测肌球蛋白I是细胞运动的主要发动机分子，而肌球蛋白II可能帮助细胞与尾部附着层脱离并推动细胞前进。

10.3.5.5 肌动蛋白和肌球蛋白II在胞质分裂中的作用

在细胞的有丝分裂后期进行的胞质分裂，主要是通过肌动蛋白和肌球蛋白形成的纤维束，并通过由这种束状纤维形成的收缩环的收缩将细胞切割开，保护了子细胞的正常形态大小（图10-63）。

通过荧光标记的抗肌球蛋白I和肌球蛋白II的抗体研究细胞的有丝分裂发现，肌球蛋白I位于细胞极，而肌球蛋白II位于收缩环，从而表明肌球蛋白II在胞质分裂过程中起作用。

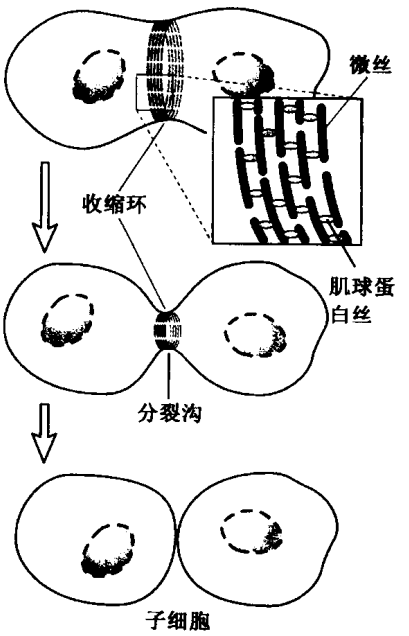


图10-63 胞质分裂中收缩环的形成及作用（引自Karp，1999）
肌动蛋白在细胞赤道处装配成环状结构，通过肌球蛋白的作用进行环的收缩形成分裂沟，最后将细胞一分为二。

10.3.5.6 肌动蛋白纤维对细胞形态的影响

在卵裂过程中，紧贴在细胞质膜下面的肌动蛋白纤维对于细胞的形态有很大的影响。这种影响不仅仅限于细胞分裂。在胚胎发育期间，组织或器官形成过程中要发生一系列细胞形态的变化。例如开始处于水平位置的细胞有可能形成圆形的群体，或者凹陷，或者从一个组织的表面突出。这些细胞和组织在形态上的变化与肌动蛋白纤维的收缩有关（图10-64）。

大多数动物细胞基本上是球形的，造成这种形状的原因是动物细胞具有流动的细胞质和具有韧性的细

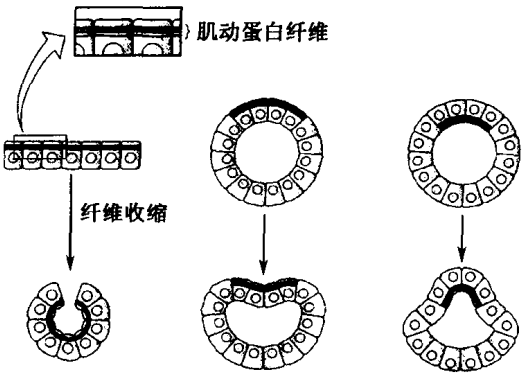


图 10-64 肌动蛋白纤维的收缩对组织形态的改变（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

左：一个扁平的细胞层能够转变成圆球形，主要是通过相同细胞同一侧肌动蛋白纤维的收缩完成的。中和右：环状组织中部分细胞肌动蛋白纤维收缩对组织形态的改变。

胞质膜。但是，有些细胞具有高度不对称的形态，这种形态的形成需要肌动蛋白纤维的作用。因为肌动蛋白纤维能够成束，这样就会使细胞的某一部分向外突出，形成不对称结构。如果用细胞松弛素处理具有不对称形态的细胞，就会变成圆形，说明肌动蛋白束在维持细胞的形态方面具有重要作用。

10.3.5.7 微丝参与胞吞和分泌

当一个吞噬细胞同一个将要被吞噬的颗粒结合时，肌动蛋白纤维很快聚集在已经被结合颗粒的细胞质膜下面，然后向细胞质扩展并将颗粒包围起来进行吞噬。这是通过细胞松弛素抑制实验发现的，由于该过程能够被细胞松弛素所抑制，所以推测与肌动蛋白纤维有关。在进行这一实验时，细胞松弛素类型的选择很重要，因为细胞松弛素 B 既能同肌动蛋白纤维结合，也能同细胞质膜结合，都有可能影响内吞作用；但是如果用细胞松弛素 D 做这样的实验就没有疑问了，因为细胞松弛素 D 只破坏肌动蛋白纤维而不会同细胞质膜结合。

同样通过细胞松弛素的实验证明肌动蛋白纤维参与细胞的分泌。但低浓度的细胞松弛素能够促进细胞分泌，而高浓度的细胞松弛素抑制细胞分泌。

10.3.5.8 限制膜蛋白的移动

由于肌动蛋白纤维常常处于细胞质膜的下方作为膜骨架的成分，因而对膜蛋白的移动具有限制作用。例如红细胞膜骨架的形成与肌动蛋白纤维密切相关，膜骨架的形成不仅影响红细胞的形态，同时也限制了红细胞膜蛋白的流动。

10.4 中间纤维

除了微管、微丝外，大多数真核生物还有第三种细胞骨架成分，由于这种纤维的平均直径介于微管和微丝之间，故称为中间纤维（intermediate filament，IF）。由于其直径约为 10nm，故又称 10nm 纤维。微管与微丝都是由球形蛋白装配起来的，而中间纤维则是由长的、杆状的蛋白质装配的。中间纤维也是 3 种骨架纤维中结构最为复杂的一种。

10.4.1 中间纤维的结构与类型

10.4.1.1 中间纤维的结构

IF 是一种坚韧的、耐久的蛋白质纤维。它相对较为稳定，既不受细胞松弛素影响也不受秋水仙素的影响。

构成 IF 的所有亚基除了能够形成直径为 10nm 纤维外，这些亚基的蛋白质都有共同的结构域结构：一个 α 螺旋的中间区，两侧是球形的 N 端和 C 端（图 10-65）。所有亚基的中间螺旋结构域都是保守的，中间杆状区又分为 4 个螺旋区，它们之间被 3 个间隔区隔开，间隔区也是非常保守的。亚基装配时靠 α 配对形成二聚体。

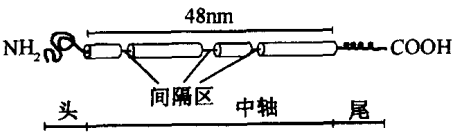


图 10-65　中间纤维的一般结构

虽然 α 螺旋区是高度保守的，但 N 端的头和 C 端的尾都是高度可变的，不同类型的 IF 的亚基在头部和尾部的大小和氨基酸组成方面有很大区别，具有不同的组成和化学性质。IF 分子质量的大小主要取决于尾部的变化，结构的关键区域在于杆状区，它们表现出形成多级螺旋所需的分子形式。

某些 IF 分子能够形成同源二聚体的纤维，而有些则能形成异源二聚体纤维。长度是可变的，一般为 40～50nm。

10.4.1.2　中间纤维的类型

不同类型的细胞以及同一细胞的不同部位发现的 IF 都有可能是由不同的亚基组成的。脊椎动物中，构成 IF 的亚基是具有高螺旋化蛋白的超家族（superfamily），根据 IF 氨基酸序列的相似性，可分为 6 种类型（表 10-4）。

表 10-4　脊椎动物细胞内中间纤维蛋白的主要类型

类型	举　例	分子质量/kDa	细胞内分布
I	酸性角蛋白（acidic keratin）	40～60	表皮细胞
II	中性/碱性角蛋白（neural or basic keratin）	50～70	表皮
III	波形蛋白（vimentin）	54	成纤维细胞、白细胞及其他细胞
	结蛋白（desmin）	53	肌细胞
	外周蛋白（peripherin）	57	外周神经元
	胶质原纤维酸性蛋白（glial firillary acidic protein）	51	神经胶质细胞
IV	神经丝蛋白（neurofilament protein）		
	NF-L	67	神经元
	NF-M	150	神经元
	NF-H	200	神经元
V	核纤层蛋白（lamin）		各种类型的细胞
	核纤层蛋白 A	70	
	核纤层蛋白 B	67	
	核纤层蛋白 C	60	
VI	巢蛋白（nestin）	200	中央神经系统的干细胞

酸性和碱性角蛋白是表皮细胞中典型的中间纤维蛋白，可按 1:1 形成异质二聚体，它们都不能组装成同质二聚体。角蛋白有很多异构体，可分为两组：一组有 10 种异构体，主要存在于坚硬的表皮细胞，如指甲、毛发；另一组含有 30 种不同的异构体，主要存在于体内一些组织的表皮。

常见的 III 型 IF 蛋白有 4 种，与 I 型和 II 型 IF 蛋白不同，它们既能形成同质二聚体，也能形成异质二聚体。分布最广泛的是波形蛋白，在白细胞、血管内皮、某些表皮细胞和成纤维细胞都有表达。它们的功能是帮助支持细胞膜。波形蛋白常常与微管结合在一起。

神经元纤维蛋白主要分布在神经元轴突中，负责轴突的生长，决定轴突末端的直径大小。

10.4.2 中间纤维的组装及去组装

微管和微丝的组装都是通过单一的途径进行的，并且在装配过程中要伴随核苷酸的水解；而 IF 组装的方式有很多种，并且不需要水解核苷酸。

10.4.2.1 中间纤维的装配

IF 的组装大致分为 3 个过程：首先是两个单体以相同的方向组成 1 个双股螺旋的二聚体，两个二聚体以相反的方向组装成 1 个四聚体，二聚体具有极性，四聚体没有极性。然后，若干个四聚体首尾结合组装成原纤维（protofilament），一个原纤维长度变化不定。最后形成的中间纤维的横切面上共有 32 个多肽（图 10-66）。

10.4.2.2 中间纤维的动态变化

IF 亚基蛋白合成后，基本上全部组装成 IF，游离的单体很少。组装成的 IF 比微管、微丝稳定。但是在某些细胞（如进入有丝分裂的细胞和刚刚结束有丝分裂的细胞）中也能看到 IF 的动态平衡的特性，在这些细胞中，IF 在有丝分裂前解聚，而在有丝分裂后在新的子细胞中进行装配。在另外一些情况下（如含有角蛋白的表皮细胞），在整个细胞分裂过程中，IF 都保持聚合状态。IF 的装配和去装配是通过磷酸化和去磷酸化进行控制。

10.4.2.3 中间纤维结合蛋白

IF 之间的相互作用或是 IF 同细胞其他结构相互作用是由中间纤维结合蛋白（intermediate filament-associated protein，IFAP）介导的，这些结合蛋白能够将中间纤维相互交联成束（也称张力丝，tonofilament），张力丝可进一步相互结合或是同细胞质膜作用形成 IF 网络。与肌动蛋白结合蛋白、微管结合蛋白不同，没有发现有 IF 切割蛋白、加帽蛋白，也没有发现有与 IF 有关的发动机蛋白。IFAP 的一个可能作用是将 IF 同微丝、微管交联起来形成大的细胞骨架网络。一些常见的 IFAP 列于表 10-5。

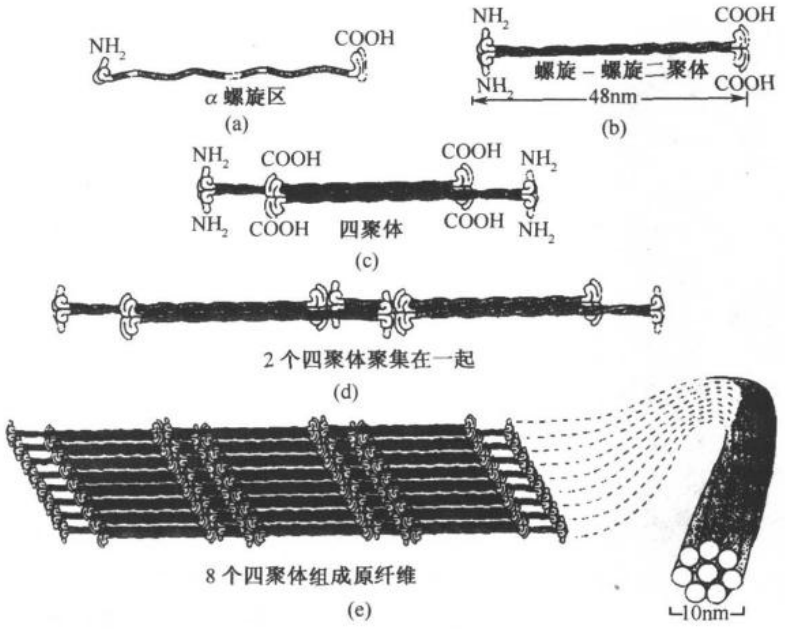


图 10-66　中间纤维的装配模型（引自 Alberts *et al*., 1998）

（a）IF 亚基单体；（b）两个单体组成二聚体；（c）两个二聚体组成四聚体；（d）两个四聚体组成八聚体；（e）8 个四聚体组成原纤维。

表 10-5　某些中间纤维结合蛋白

名　称	分子质量/kDa	存在部位	功　能
BPAG1*	230	半桥粒	将 IF 同致密斑交联
斑珠蛋白（plakolobin）	83	桥粒	将 IF 同致密斑交联
桥粒斑蛋白 I（desmoplakin I）	250	桥粒	将 IF 同致密斑交联
桥粒斑蛋白 II（desmoplakin II）	215	桥粒	将 IF 同致密斑交联
网蛋白（plectin）	300	皮层	波型蛋白交联接头，与 MAP1，MAP2 以及血影蛋白交联
锚蛋白（ankyrin）	140	皮层	波形蛋白与膜交联
丝聚蛋白（filaggrin）	30	细胞质	角蛋白交联
核纤层蛋白 B 受体（lamin B receptor）	58	核	核纤层蛋白与核内表面交联

* 大泡性类天泡疮抗原（bullous pemphigoid antigen 1）。

10.4.3　中间纤维的功能

对中间纤维的功能了解较少，主要原因是迄今没有找到一种能够同中间纤维结合的药物。

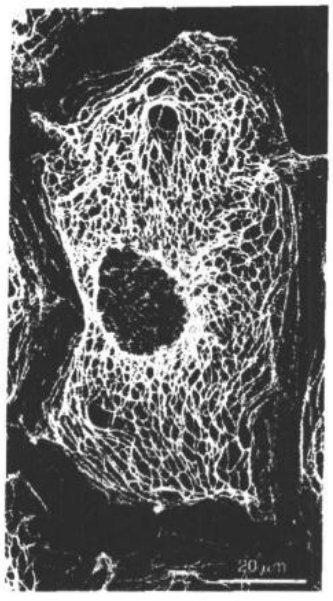


图 10-67　培养的表皮细胞中角蛋白纤维网络（引自 Kleinsmith *et al*.，1995）

10.4.3.1　为细胞提供机械强度支持

从细胞水平看，IF 在细胞质内形成一个完整的支撑网架系统。它通过整联蛋白与细胞质膜和细胞外基质相连，在内部与细胞核表面和核基质直接结合；中间纤维可直接与 MT、MF 及其他细胞器相连，赋予细胞一定的强度和机械支持力。如结缔组织中的波形蛋白纤维从细胞核到细胞质膜形成一个精致的网络，这种网络或同质膜或与微管锚定在一起（图 10-67）。

虽然多年来一直认为中间纤维对细胞的形态提供机械支持，但没有直接的实验验证据。直到 1991 年，通过转基因技术才真正获得中间纤维确实为细胞的形态提供机械支持。研究者将一个突变的编码角蛋白的基因克隆到质粒载体，然后通过微注射的方法将重组质粒 DNA 注射到鼠受精卵的细胞核中。将转基因的受精卵培养成囊胚后转入代孕妈妈的子宫，让其发育成鼠。在子代中出现了因角蛋白基因突变致使角蛋白中间纤维不能正确组装，从而出现皮肤水疱的转基因鼠（图 10-68）。

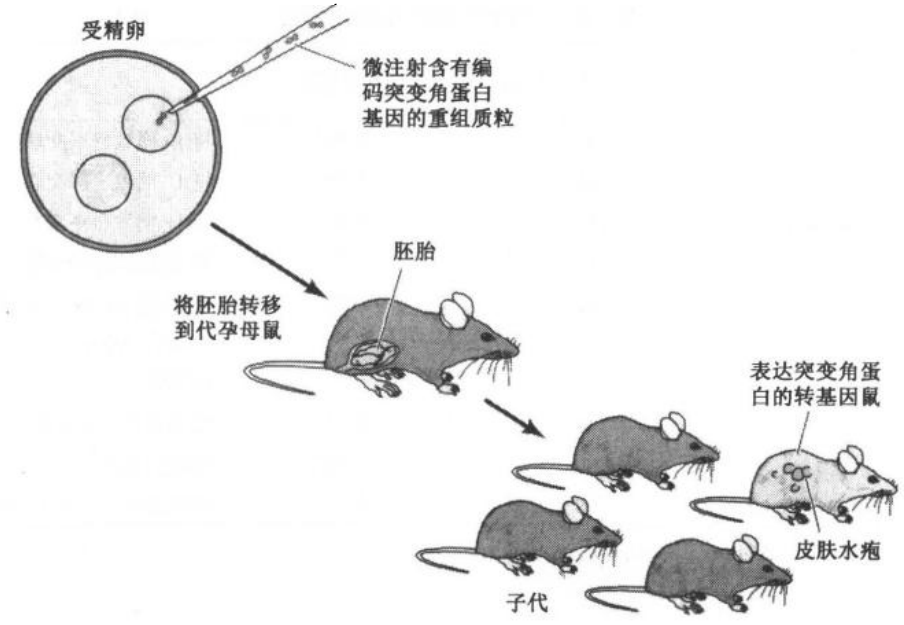


图 10-68　角蛋白功能的实验证明（引自 Cooper，2000）

10.4.3.2　参与细胞连接

一些器官和皮肤的表皮细胞是通过桥粒和半桥粒连接在一起的。桥粒介导细胞-细胞的黏

着，半桥粒介导细胞与细胞外基质的黏着。IF 参与黏着连接中的桥粒连接和半桥粒连接，在这些连接中，中间纤维在细胞中形成一个网络，既能维持细胞形态，又能提供支持力。

10.4.3.3 中间纤维维持细胞核膜稳定

在细胞核内膜的下面有一层由核纤层蛋白组成的网络，对于细胞核形态的维持具有重要作用，而核纤层蛋白是中间纤维的一种。组成这种网络结构的核纤层蛋白 A 和 C，它们交联在一起，然后通过核纤层蛋白 B 附着到内核膜上，在内核膜上有核纤层蛋白 B 的受体。此外，中间纤维在胞质溶胶中也组成网络结构，分布在整个细胞中，维持细胞的形态。

另外，由于中间纤维蛋白的表达具有组织特特异性，并且与细胞分化有着极密切的关系，已引起科学家的关注，目前的研究主要集中在胚胎发育和上皮分化上。

10.4.4 三种细胞骨架的比较

与微管和微丝相比，IF 在结构和功能上至少有 3 方面的差异。首先，IF 是相当稳定的结构，即使用含有去垢剂和高盐溶液处理细胞，IF 仍然保持完整无缺。在这种条件下，微管和微丝则要去聚合并溶解在溶液中。实际上，大多数分离纯化 IF 的方法都是先去除其他的蛋白

表 10-6 微管、微丝和中间纤维的主要特性比较

内容	微管	微丝	中间纤维
蛋白质组成	微管蛋白异二聚体	球形肌动蛋白	6 类中间纤维蛋白
分子质量/Da	50×10^3	43×10^3	$40\times10^3\sim200\times10^3$
细胞内分布	靠近细胞核	细胞质膜内侧	整个细胞
纤维直径/nm	24	7	10
纤维结构特点	13 根原纤维组成空心管状纤维	两条原纤维组成双股螺旋	32 条原纤维组成非空心的多级螺旋
极性	有	有	无
单体蛋白库	有	有	无
踏车现象	有	有	无
特异性药物	秋水仙素	细胞松弛素 B	无
	紫杉醇	鬼笔环肽	
	常春花碱（vinblastine）	swinholide	
	nocodazole	latrunculin	
结合蛋白	有	有	无
主要功能	轴丝： 细胞游动细胞质： 动物细胞形态的组织与保持；染色体分离；细胞器的分布与转移	肌收缩；变形运动；胞质环流；细胞爬行；细质分裂；保持动物细胞的形态	支持结构；保持动物细胞的形态；形成核纤层和核骨架；提高神经细胞轴突的强度；保持肌纤维的稳定（结蛋白）

质，然后用尿素处理使其变性，再用离子交换来纯化 IF。第二，IF 在体积上与微管和微丝是不同的，微管的直径为 24nm，微丝的直径则是 7nm，而中间纤维是 10nm。而且形态上也不相同，微管是由 αβ 微管蛋白二聚体组装成的中空管状，微丝是由球形亚基装配成的 α 螺旋纤维，而中间纤维是由 α 螺旋杆状亚基装配成似杆状的结构。第三，IF 的亚基并不同核苷酸结合，而微管的亚基与 GTP 或 GDP 结合，微丝的亚基则与 ATP 或 ADP 结合，但对于中间纤维装配的许多细节尚不清楚。表 10-6 将 3 种细胞骨架的一些主要特点进行了比较。

提　要

细胞骨架是细胞内以蛋白质纤维为主要成分的网络结构，包括微管、微丝和中间纤维，具有多种功能。

微管主要分布在核周围，它由微管蛋白异源二聚体组成。微管有单管、二联管和三联管，其中单管不稳定，二联管和三联管稳定。微管的体外组装分为成核和延长两个过程，其中成核是限速步骤。微管有（+）端和（-）端，因此微管具有极性。影响微管体外装配稳定性的因素有 GTP 浓度、压力、温度、pH、微管蛋白临界浓度、药物等。细胞内的微管处于动态不稳定状态。微管通过与微管结合蛋白（MAP）结合扩展其功能。

微管的功能有；支架作用、细胞内物质运输的轨道、纤毛和鞭毛的构件、参与细胞的有丝分裂和减数分裂等。

微丝又称肌动蛋白纤维，由肌动蛋白组成。微丝的装配分三个阶段：成核、快速延长和稳定，其中需 ATP 的参与。这一过程受 G-肌动蛋白临界浓度和一些离子浓度的影响。肌动蛋白也有踏车现象。微丝的稳定性受细胞松弛素和鬼笔环肽的影响。

分子发动机是一类利用 ATP 供能，产生推动力，进行细胞内物质的运输或运动的蛋白。分子发动机有肌球蛋白家族、驱动蛋白家族和动力蛋白家族等。其中驱动蛋白和动力蛋白是以微管作为运行的轨道，而肌球蛋白则是以微丝作为运行的轨道。分子发动机的运输是单方向的、逐步进行的。驱动蛋白在神经细胞中的功能是将物质从神经细胞的胞体运向轴突末端，并沿微管的（-）端向（+）端移动。细胞质动力蛋白的移动方向则相反，它是有丝分裂中染色体运动的力的来源，也参与小泡和膜结合细胞器的运输。

肌球蛋白是一种肌动蛋白纤维的分子发动机，研究的较为清楚的有肌球蛋白 I、肌球蛋白 II 和肌球蛋白 V。肌球蛋白 II 为肌收缩和细胞质分裂提供力，肌球蛋白 II 和肌球蛋白 V 则涉及细胞骨架与膜之间的相互作用。

中间纤维是 3 种骨纤维中最复杂的一种，它的装配分 3 个过程：由单体形成二聚体，再由二聚体形成四聚体，然后 8 个四聚体组成原丝。中间纤维的功能有：为细胞提供机械强度支持、参与细胞连接、是核骨架的主要成分并维持细胞核膜稳定。

11　细胞核与染色体

细胞核（cell nucleus）是细胞内储存遗传物质的场所。真核生物的细胞都有细胞核，只有成熟的红细胞和植物成熟的筛管没有细胞核。细胞核主要有两个功能：一是通过遗传物质的复制和细胞分裂保持细胞世代间的连续性(遗传)；二是通过基因的选择性表达，控制细胞的活动。

一般教科书上见到的细胞核通常是球形的，位于细胞中央的一个大型膜包被的细胞器。实际上，在不同类型的细胞中，细胞核的形态、大小和位置是不同的，通常是球形，但也有长形、扁平和不规则的形态。典型的细胞核的体积约为细胞体积的 5%～10%，但在某些情况下，细胞核的体积占细胞总体积的 80%或更多。细胞核大小的变化是由细胞核所含有的 DNA，以及细胞生理状态决定的。细胞核的直径范围从 1 微米到几百微米不等，平均为 5～15μm。细胞核在细胞中的位置也是多变的，并不都是位于细胞的中央。一般来说，一个细胞只有一个细胞核，有些特殊的细胞含有多个细胞核，例如脊椎动物的骨骼肌细胞，这种细胞很长，可达几个微米，甚至几个厘米，其中含有几十甚至几百个独立的细胞核。

在细胞间期观察到典型的真核生物细胞核的结构有五个主要组成部分（图 11-1）：①由双层膜组成的核被膜，它将细胞核物质同细胞质分开；②似液态的核质（nucleoplasm），其中含有可溶性的核物质；③一个或多个球形的核仁，这种结构与核糖体的合成有关；④核基质(nuclear matrix)，为细胞核提供骨架网络；⑤DNA 纤维，当它展开存在于细胞核中时称为染色质，组成致密结构时称为染色体。

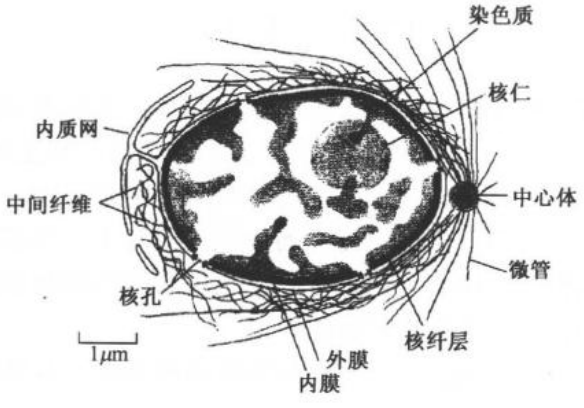


图 11-1　间期细胞核的形态结构(引自 Alberts *et al*.,1998)

原核生物没有真正的细胞核，而只有拟核（nucleiod)。在细胞水平上原核和真核有 3 方面主要差别：①核膜：真核细胞有核膜，原核细胞没有核膜，称之为拟核；②核仁：真核细胞有核仁，原核细胞无核仁；③核内遗传物质的存在状态：真核细胞内 DNA 同组蛋白结合，

有染色体结构；近年发现原核 DNA 也同蛋白质结合，但无染色体结构。

11.1 核 被 膜

真核生物的细胞核是在细胞周期的间期才能见到的细胞内的结构，此时的染色质被两层单位膜包被，因此核被膜（nuclear envelope）是细胞核最外层的两层膜结构，它的形成对于细胞的生命活动具有重要意义。

11.1.1 核被膜的结构

核被膜的结构比较复杂，它由外核膜、内核膜、核周腔、核孔复合物和核纤层等 5 个部分组成（图 11-2）。

图 11-2 核被膜的结构（引自 Cooper，2000）

核被膜是由内、外两层核膜所组成，外膜与内膜相连，表面附有大量的核糖体颗粒。内膜面向核质；内、外膜间有 15～30nm 的透明腔，称为核周腔，膜上有孔。

外核膜（outer nuclear membrane） 外核膜面向细胞质基质，常附有核糖体，有些部位与内质网相连，因此在形态和性质上与内质网相似。实际上，外核膜可以看成是内质网膜的一个特化区。另外，细胞骨架成分，包括微管、肌动蛋白纤维和中间纤维常常与外核膜相连，起着固定细胞核并维持细胞核适当形态的作用。

内核膜（inner nuclear membrane） 内核膜面向核基质，与外核膜平行排列，其表面没有核糖体颗粒。

核纤层（lamina） 在与核质相邻的核膜内表面有一层厚 30～160nm 网络状蛋白质，叫核纤层，对核被膜起支撑作用。核纤层由 3 种分子质量为 60～70 万 kDa 的多肽亚单位 A、B、C 所组成，属于中间纤维的一种。在某些细胞中核纤层在内核膜的内侧形成连续的层，而有些细胞中的核纤层蛋白形成一段一段的网络结构。核纤层纤维的直径约 10 nm，是由核纤层蛋白构成的。

核周腔（perinuclear space）　又称核周间隙，是两层核膜之间的间隙，宽 15～30nm，其中充满不定型物质。由于外核膜与糙面内质网相连，所以核周腔常与 ER 的腔相通。

11.1.2 核孔复合物

核被膜上有许多孔，称为核孔（nuclear pore），是细胞核膜上沟通核质与胞质的开口，由内外两层膜的局部融合所形成，核孔的直径为 80～120nm。一个典型的哺乳动物的核膜上有 3 000～4 000 个核孔，相当于每平方微米的核膜上有 10～20 个。一般来说，合成功能旺盛的细胞，核孔的数量就多，如非洲爪蟾的一个卵细胞就有 1 000 万个核孔。核孔的结构相当复杂，是以一组蛋白质颗粒以特定的方式排布形成的结构，它可以从核膜上分离出来，被称为核孔复合体（nuclear pore complex，NPC）（图 11-3）。

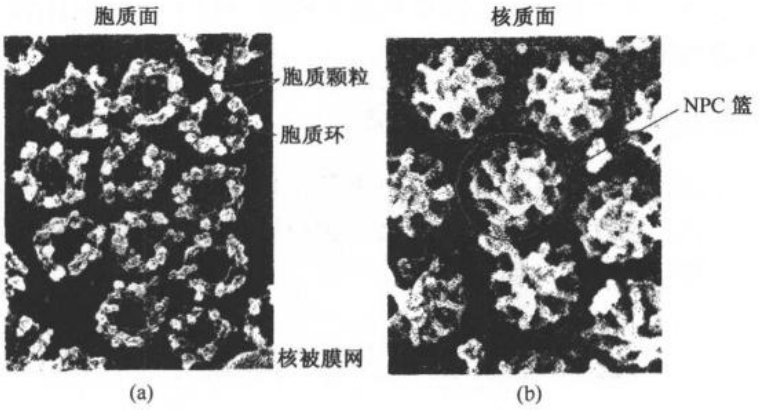


图 11-3　高分辨率扫描电镜观察的核孔复合体照片(引自 Lodish *et al*.,1999)
(a) 两栖类卵细胞分离的 NPC 的细胞质面，细胞质颗粒覆盖在 NPC 的胞质环上；(b) 当观察 NPC 核质面时，可以看到与核孔复合体相连的篮。

NPC 是一轮形结构，外径 120 nm，并呈现八面对称（图 11-4）。轮毂是一个圆柱形的活塞（plug），称之为中央运输蛋白（central transporter）。从中央运输蛋白向外伸出 8 个辐条（spoke），它们与核孔复合物的细胞核面的核质环（nucleoplamic ring）和细胞质面的胞质环（cytoplasmic ring）相连。在胞质环的表面常有 8 个细胞质颗粒位于其上，而核质环上有细纤丝伸向核质，形成笼形结构，称之为笼状体（basket）。在某些生物中，NPC 笼状体常同一种交织的纤维层相连，称之为核被膜格（nuclear envelope lattice）。后来发现在胞质环上也有细胞质纤维伸向细胞质。由于这种结构像鱼笼，所以有人称之为鱼笼模型。

11.1.3 核被膜的功能

核被膜是真核生物和原核生物之间的重要区别，具有十分重要的功能。

11.1.3.1 基因表达的时空隔离

在原核生物中，基因表达是连续进行的，即 mRNA 的转录和蛋白质的翻译相偶联，主要是因为原核生物的基因转录物无须经过剪接；真核生物的结构复杂，而且大多数基因都有内含子，转录后需要经过复杂的加工，所以核膜的出现，为基因的表达提供了时空隔离的屏障，便于 DNA 在核内活动的多样性，DNA 转录形成 RNA 的多样性，从而导致细胞的多样性。

11.1.3.2 核膜作为保护性屏障，使核处于一微环境中

细胞核是在进化过程中形成的。在细胞的遗传信息储存量越来越丰富以及由遗传信息所指导的代谢规模越来越大的情况下，有必要将携带遗传信息的染色质与细胞的其他部分隔离开来。核膜的出现，为细胞遗传信息的保存、复制、传递及发挥其对细胞代谢和发育的指导作用创造了特定的微环境，提高了上述各项活动的效率；避免直接受细胞内其他各种生命活动的干扰，并防止细胞中这个指挥中心的功能轻易地随环境条件的变化而变化，以保持其相对的稳定性，这些都是核膜出现的进化意义。

11.1.3.3 染色体的定位和酶分子的支架

染色质通过核纤层同核膜相连，使之多而不乱，保证了有序性。另外，核内的一些酶是以膜蛋白的形式存在的，这就有利于核内生化反应的区域化，从而发挥高度的催化活性。所以核膜是染色体和酶分子的支架和固着部位。

11.2 核孔复合体的运输作用

核被膜最主要的功能是运输作用，这是通过核孔复合体来完成的，也就是说核孔复合体的功能是进行物质运输。

1965 年，Eldherr 将各种不同大小的金颗粒注射到变形虫的细胞质中，然后检查这些颗粒进入细胞核的情况，发现：金颗粒很快进入了细胞核，但体积越大进入的速度就越慢，大于 10nm 的金颗粒进不了细胞核。由此推测：核孔复合物可作为水性的运输通道，允许小分子的物质自由扩散出入细胞核。

11.2.1 核孔运输的一般特点

核孔复合物作为运输通道既有被动运输，又有主动运输。被动运输是通过简单扩散，一些离子、代谢物和分子质量小的蛋白质（在 40kDa 以下）可通过 NPC 的辐条之间的狭缝进出细胞核。高分子质量的物质（包括大多数蛋白质和核质蛋白）通过 NPC 的能力与它们在细胞内的正常定位有关，非核蛋白是不进入细胞核的。像核糖体亚基这样大的复合物也能够通过核孔运输，这说明 NPC 的运输，除了具有选择性外，核孔的孔径是可调节的。

虽然在核膜上尚未发现 Na^+/K^+ 泵的运输系统，但细胞核内的 K^+ 高于细胞质，而 Na^+ 低于核外的现象是存在的。另外小分子通过核膜亦有一定的选择性，如甘油和蔗糖可自由进

出大鼠的肝细胞核，而小肠细胞核却阻止半乳糖进入。

NPC的主动运输是一个信号识别与载体介导的过程，需要ATP，并表现出饱和动力学特征。

NPC进行的运输不仅具有选择性，而且具有双向性，不仅能够将翻译所需要的RNA、组装好的核糖体亚基从细胞核内运送到细胞质，同时也能把DNA复制和转录所需的酶以及帮助DNA装配的一些蛋白质从细胞质运进细胞核，这些蛋白均是在细胞质的游离核糖体上合成的（图11-5）。

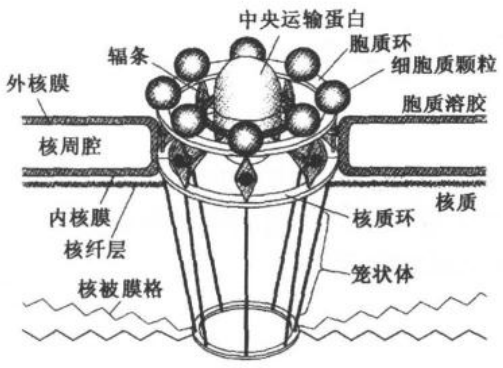


图11-4　核孔复合物的结构模型
（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）
该三维模型显示了核孔复合物与核被膜的内、外核膜的关系。中央运输蛋白伸出的8个辐条与胞质环和核质环相连，另有8个笼状体和8个细胞质颗粒在核孔复合物中呈现八重对称分布。

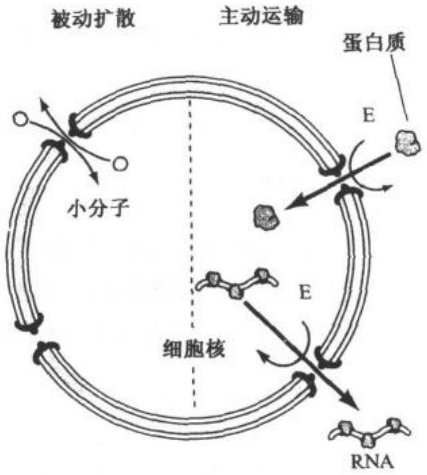


图11-5　核孔的运输作用
（引自 Cooper, 2000）

11.2.2　核孔运输的信号引导

在生理状态下，RNA的输出可能是一种具有高度选择性的信号指导的过程。在RNA聚合酶II指导下合成的RNA（mRNA和snRNA），当其5′端具有 m^7 GpppG帽子结构时，即被定位于细胞质，而没有帽子结构的snRNA则定位在细胞核。将游离的具有帽子结构的类似物 m^3GpppG二核苷酸向核内进行连续注射，发现可抑制新转录的具有 m^7G帽子的U1 snRNA的核输出；而注入 m^7GpppG却没有这种效应，说明5′端 m^7G帽子结构对于mRNA及U1 snRNA的核输出具有上导作用。这种现象称作帽结合活性（cap binding activity，CBA）。在细胞核中由RNA聚合酶II合成的U1、U2、U4和U5 snRNA在合成之后立即在5′端加上 m^7G的帽子结构，然后这些加工过的snRNA被运输到细胞质中同相应的蛋白质组装成snRNP，再运回到细胞核参与RNA的剪接。但是，由RNA聚合酶III合成的U6 snRNA的5′端没有 m^7G的帽子结构，只有一个三磷酸核苷，所以它不会被运送到细胞质中。后来有人将RNA聚合酶Ⅲ的启动子同U1 snRNA连接起来，转录成的U1 snRNA也不能被运送到细胞质（图11-6）。

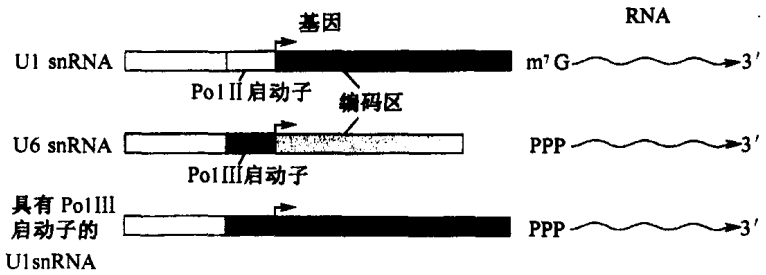


图 11-6　U1 snRNA从细胞核向细胞质运输需要 5′帽子结构的实验证明（引自 Lodish *et al.*，1995）

11.2.3　核蛋白、核定位信号、输入蛋白、输出蛋白

11.2.3.1　核蛋白

核蛋白（nuclear protein）是指在细胞质中合成，然后运输到核内起作用的一类蛋白质。如各种组蛋白、DNA 合成酶类、RNA 转录和加工的酶类、各种起调控作用的蛋白因子等。核蛋白一般都含有特殊的氨基酸信号序列，作为核孔运输的信号。

11.2.3.2　核定位信号

核定位信号（nuclear localization signal，NLS）是另一种形式的信号肽，这种信号肽序列可以位于多肽序列的任何部分。一般含有 4～8 个氨基酸，且没有专一性，作用是帮助核蛋白进入细胞核，这种入核信号与导肽的区别在于：①由含水的核孔通道来鉴别；②核定位信号是蛋白质的永久性部分，在进入细胞核后，并不被切除，可以反复使用，有利于细胞分裂后核蛋白重新输入核。

表 11-1　几种核定位信号的结构（黑体表示入核必需的氨基酸残基）

信号类别	蛋白名称	信号在蛋白中的位置	信号序列
单信号	SV40 病毒大 T 抗原	残基 126～132	Pro **Lys Lys Lys Arg Lys** Val
	腺病毒 E1a	C 端	Lys Arg Pro **Arg** Pro
	流感病毒核蛋白	靠近 C 端	Ala Ala Phe Gly Asp Leu **Arg** Val
		336～345	Leu **Ser**
二重信号	非洲爪蟾核质蛋白	靠近 C 端	**Lys Arg** Pro Ala Ala Thr Lys Lys
		155～171	Gly Gln Ala **Lys Lys Lys Lys** Leu
	非洲爪蟾 N1 核蛋白	内部	**Lys Arg** Lys Thr Glu Glu Glu Ser
		534～550	Pro Leu Lys Asp **Lys** Asp Ala **Lys Lys**
	酵母 SW1 5 转录	内部	**Lys Lys** Tyr Glu Asn Val Val Ile
	因子	636～652	Lys Arg Ser Pro **Arg Lys Arg** Gly **Arg**
	鼠 poly-ADP 核糖	内部	**Arg Lys** Gly Asp Glu Val Asp Gly
	体聚合酶	208～224	Thr Asp Glu Val Val **Lys Lys Lys Ser**
	鸡雌激素受体	内部	**Arg Lys** Asp Arg Arg Gly Gly Glu
		205～260	Met Met Lys Gln **Lys Arg** Gln **Arg** Glu

有多种类型的核定位信号（表 11-1），这些信号都具有一个带正电荷的核心序列。第一个被确定的 NLS 序列的蛋白质是 SV40 的 T 抗原（分子质量为 92kDa），它在细胞质中合成后很快积累在细胞核中，是病毒 DNA 在核内复制所必需的蛋白质。其野生型的信号肽序列为 Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val，即使单个氨基酸突变所产生的突变型 NLS（Pro-Lys-Tyr-Lys-Arg-Lys-Val）也能阻止这种蛋白质进入细胞核而停留在细胞质中。如果将这种信号接到非核蛋白的随机 Lys 的侧链上，则非核蛋白也能转变成核蛋白。

与核定位信号相对的是核输出信号（nuclear export-signal，NES），作为核内物质输出细胞核的信号，帮助核内的某些分子迅速通过核孔进入细胞质，位于在核内合成然后被运输到细胞质中工作的生物分子中。另外，有些蛋白质并非是核内常住“人口”，通常要往返于核质和胞质之间，这些穿梭蛋白既有 NLS 又有 NES。

11.2.3.3 输入蛋白与输出蛋白

仅有核定位信号的蛋白质自身不能通过核孔复合物，它必须与水溶性的 NLS 受体结合，才可穿过核孔复合体，这种受体称为输入蛋白（importin）。输入蛋白分布在胞质溶胶，它们作为一种穿梭受体（shuttling receptor）在细胞质中识别并与核蛋白的核定位信号结合，然后一起穿过核，在核内与核蛋白分离后再返回到细胞质中。

输出蛋白（exportin）存在于细胞核中、能够识别输出信号并与之结合的蛋白质，帮助核内物质通过核孔复合体输出到细胞质，然后快速通过核孔回到细胞核中。

11.2.4 核运输系统

由于 NPC 的运输是双向的，所以核运输系统（nuclear-transport system）包括核蛋白的输入和核物质的输出。

11.2.4.1 核蛋白的输入

核定位信号与核蛋白的输入最早是通过核质蛋白的注射实验发现的。核质蛋白（nucleoplasmin）是一种丰富的核蛋白，具有头尾两个不同的结构域，由 5 个单体组成，分子质量为 165kDa，是耐热性可溶蛋白。尾部具有核定位信号，体外实验证明只要有一个尾部结构，就可将全部的头部带入细胞核（图 11-7）。

根据对核蛋白运输机制的研究和相关蛋白质的发现，提出了核蛋白的运输模型（图 11-8）。

按照这一推测的模型，在细胞质中的输入蛋白 α 亚基、输入蛋白 β 亚基和货物蛋白(cargo protein)相互作用形成一个运输复合体，其中输入蛋白 α 亚基识别并与 NLS 结合。而运输蛋白 β 亚基与 NPC 作用，将复合物转运到细胞核中。在此过程中需要消耗 ATP。核输入作用还需要第四种蛋白质，Ran 蛋白，这是一种小 GTPase，它与 GTP 或 GDP 结合时的构型是不同的。在细胞核中，Ran·GTP 与输入蛋白 β 亚基相互作用，导致货物蛋白与复合物脱离，成为细胞核中的游离蛋白。为了进行下一个运输循环，输入蛋白 α 亚基和输入蛋白 β 亚基-Ran·GTP 复合物重新回到细胞质。细胞质中的 Ran·GTP 激活蛋白（RanGAP）促进 Ran

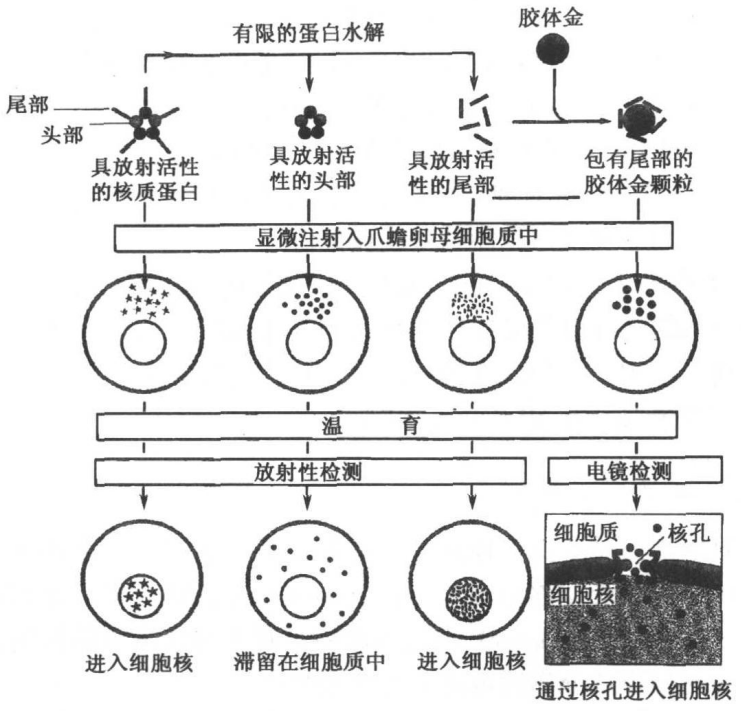


图 11-7　核质蛋白输入细胞核的实验证明（引自 Alberts *et al*., 1994）

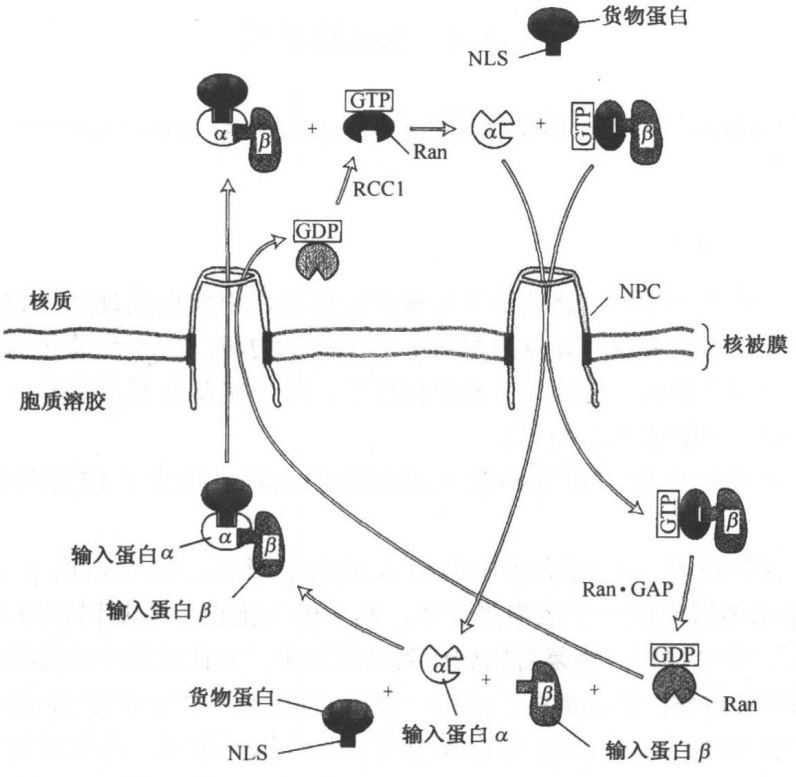


图 11-8　含有 NLS 信号的核蛋白从细胞质输入细胞核的推测模型（引自 Lodish *et al*., 1999）

将 Ran·GTP 转变成 Ran·GDP，并使 Ran·GDP 与输入蛋白 β 亚基脱离，游离的输入蛋白 β 亚基和 α 亚基一起参与新的具有 NLS 信号的入核蛋白的运输。而 Ran·GDP 可通过 NPC 回到细胞核中，在 Ran 核苷交换因子 1（Ran nucleotide-exchange factor 1，RCC1）的作用下，释放 GDP，重新结合 GTP。

11.2.4.2 核内 RNA 和蛋白质的输出

细胞核内的物质输出到细胞质也是信号介导的过程。细胞核内输出到细胞质的两类主要物质是各种 RNA 和核糖体亚基。输出的 RNA 中，mRNA 是最多也是最重要的。细胞核中合成的 RNA 很快与蛋白质形成异质核糖核蛋白（heterogeneous ribonucleoprotein，hnRNP），经加工成成熟的信使 RNP（messenger RNP，mRNP）后被运输到胞质溶胶。昆虫 *Cironomous tentans* 幼虫的唾腺是研究 hnRNP 的形成和 mRNP 输出的很好模式系统。在这些幼虫中，大染色体胀泡（puff），又称巴尔比亚尼环（Balbiani ring，BR）中的基因大量转录成新的前 mRNA，并与蛋白质结合形成直径为 50nm 的螺旋 hnRNP（图 11-9）。

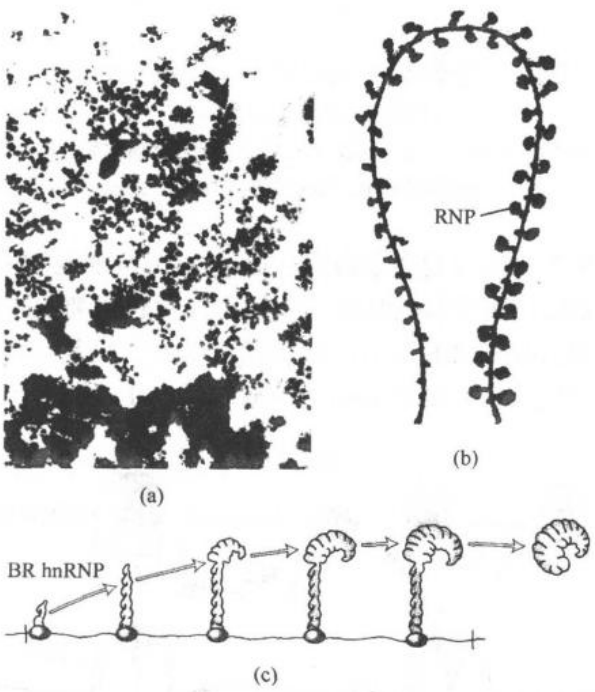


图 11-9 *Cironomous tentans* BR mRNA 合成时螺旋状的 hnRNP 的形成.(引自 Lodish *et al*., 1999)
(a) 活跃转录的染色质环的电镜照片，显示特征性颗粒（箭头所指）；(b) 单个转录环的形成，其上结合许多 RNP 颗粒；(c) BR hnRNP 的结构和生物发生模型。

通过电子显微镜研究揭示，BR 前 mRNA 加工之后形成的 mRNP 通过核孔进入胞质溶胶，形成非螺旋的 mRNP，然后同核糖体结合，据此推测，mRNP 的 5′端引导通过 NPC。

在上述研究的基础上提出了一个关于 BR mRNP 通过 NPC 运输的模型（图 11-10）。

研究表明，核内某些要输出的蛋白质具有 NES，在输出蛋白和 Ran 蛋白的帮助下通过核孔输出到细胞质。图 11-11 是含有 NES 蛋白的核输出模型。

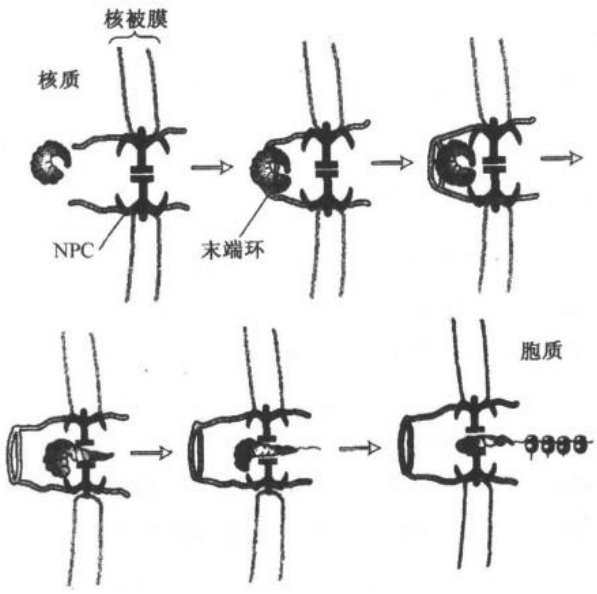


图 11-10　根据电子显微镜研究提出的 BR mRNA 输出核孔复合体的模型

（引自 Lodish *et al*.，1999）

螺旋化的 mRNP 移向 NPC 的末端环，当它通过 NPC 的中央活塞时解螺旋。5′端引导并与核糖体结合，在运输过程中，NPC 发生了构型的变化。

按照这一模型，输出蛋白质（货物蛋白质）通过 NES 与细胞核中特异的核输出受体，即核输出蛋白 1 的结合达到输出细胞核的目的。核输出作用也需要 Ran 蛋白。输出蛋白 1 能够同时与 Ran·GTP 和货物蛋白的 NES 作用，形成三分子的货物复合体。然后三体复合物通过至今尚不清楚的机制通过核孔。一旦 Ran·GTP -输出蛋白 1 -货物蛋白复合体到达胞质溶胶，

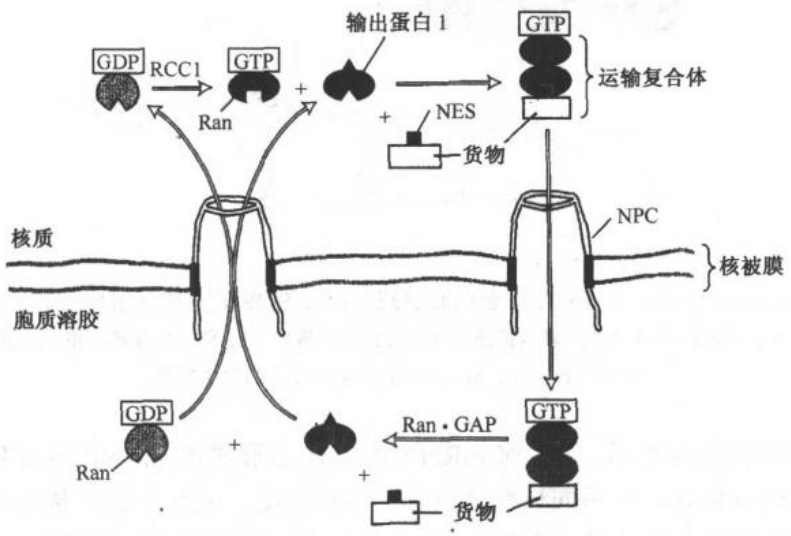


图 11-11　含有丰富亮氨酸核输出信号的货物蛋白的输出模型

（引自 Lodish *et al*.，1999）

Ran·GTP 激活蛋白（RanGAP）促进 Ran 水解与之结合的 GTP，形成 GDP，致使 Ran 蛋白产生构型的变化，使三体复合体解体，最后将货物蛋白释放出来。游离的输出蛋白 1 和 Ran·GDP 重新通过核孔回到细胞核，在细胞核中 RCC1 促使 Ran 释放 GDP 并结合上 GTP，开始下一轮的运输作用。

细胞核中除了要将 mRNA、tRNA、rRNA 和蛋白质运输到胞质溶胶外，一些 snRNA 也要通过核孔输出到胞质溶胶，这是因为一些 snRNA 需要与细胞质中相关蛋白质装配成snRNP 并返回细胞核后才能行使功能（图 11-12）。推测 snRNA 输出细胞核时需要输出蛋白与其 5′端帽子的结合，而 snRNP 输入细胞核则靠 snRNP 蛋白质中入核信号的作用。

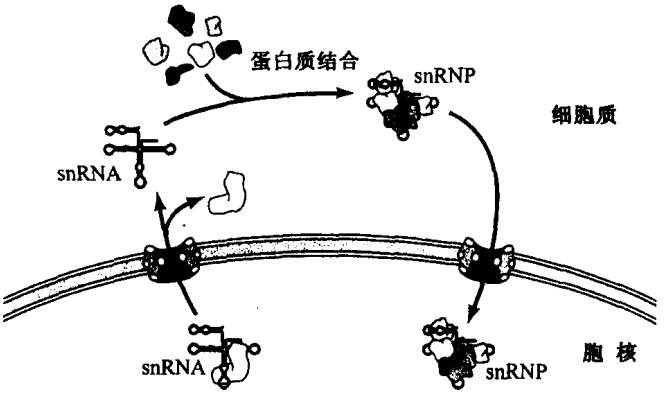


图 11-12　snRNA 输出与输入细胞核（引自 Cooper，2000）

11.3　分 子 伴 侣

分子伴侣（molecular chaperone）是细胞中一大类蛋白质，它们的作用广泛，但都有一个基本的特性，就是“乐于助人”。

11.3.1　分子伴侣的发现及种类

11.3.1.1　第一个被发现的分子伴侣：核质蛋白

第一个被发现具有分子伴侣功能的蛋白质是核质蛋白，它在细胞核中通过降低组蛋白的正电荷，帮助组蛋白和 DNA 形成正常的核小体，其本身并不成为核小体的组成成分。

核质蛋白是 Laskey 等人于 1978 年在非洲爪蟾卵的浸出液中发现的。这种蛋白质在细胞质中合成后就通过核定位信号运送到细胞核，它们对于 DNA 与组蛋白组成核小体是必不可少的，否则 DNA 与组蛋白在组装过程中就会沉淀，因而不能形成正常的核小体。核质蛋白的作用在于既能促进组蛋白与 DNA 的相互作用，又能避免 DNA 与组蛋白间因强静电吸引而形成非特异结合的不溶性聚合物，但它本身并不参与核小体的组成。

核质蛋白是一种大分子（165kDa）、五聚体、耐热的可溶性蛋白质，在爪蟾卵母细胞核中大量存在。

11.3.1.2 分子伴侣的概念及其特点

1978 年 Laskey 等人在核小体装配实验中首次使用“伴侣蛋白”来描述核质蛋白在核小体组装过程的作用。1991 年 Ellis 等人提出了分子伴侣的基本概念：是由不相关的蛋白质组成的一个家系，它们介导其他蛋白质的正确装配，但自己不成为最后功能结构中的组分。

这个概念有 3 个特点：①凡具有这种功能的蛋白，都称为分子伴侣，尽管是完全不同的蛋白质；②作用机制是不清楚的，故用了“介导”二字。“介导”二字可理解为：通过催化的或非催化的方式，加速或减缓组装的过程，传递组装所需要的空间信息，也可能抑制组装过程中不正确的副反应。③分子伴侣一定不是最终组装完成的结构的组成部分，但不一定是一个分离的实体。组装的涵义比较广，主要指：帮助新生肽的折叠，还帮助新生肽成熟为活性蛋白，包括跨膜定位、亚基组装等。

11.3.1.3 分子伴侣的种类

分子伴侣的分布很广，从细菌到人、动物和植物。在细胞质、线粒体、叶绿体和微体中都有存在。根据同源性分析初步分成 10 类（表 11-2）。

表 11-2 分子伴侣的分类和分布

分　类	种　属	细胞内的定位
核质蛋白家族		
Nucleoplasmin	真核生物	细胞核基质
Protein XLNO-38	真核生物	细胞核基质
Nucleoplasmin S	真核生物	细胞核基质
Hsp70 家族		
Hsp70（Hsp40、Hsp24）	所有生物	细胞质和细胞骨架，热休克后移至细胞核及核仁质膜上；哺乳动物线粒体
DnaK（DnaJ、GrpE）	大肠杆菌	细胞质
Ssa1-4、SsB1、SsC1、SsD1	酵　母	细胞质和线粒体
Bip	哺乳动物	内质网
Hsc70	动物细胞	胞浆
grp78	哺乳动物	内质网
prp73	动物细胞	胞浆
Kar2p	酵　母	内质网
Hsp60 家族		
GroEL（GroES）	大肠杆菌	细胞质
cpn60（cpn10）	真核细胞	线粒体和叶绿体基质
RBP	植　物	叶绿体
Mif4p	酵　母	线粒体

续表

分　类	种　属	细胞内的定位
TCP-1 家族		
TF55	古细菌	细胞质
Tric（TCP-1）	真核生物	细胞质
Thermosme	古细菌如嗜酸热原体	细胞质
Hsp90 家族		
HtpG	大肠杆菌	细胞质
Hsp90	哺乳动物	细胞质
Hsp83，Hsp87	酵母和果蝇	细胞质
Grp94	哺乳动物	内质网
Hsp100 家族		
Hsp104	酵　母	细胞质和核、核仁中
ClpX	大肠杆菌	细胞质
分子内伴侣		
Subtilisin prosequen	枯草杆菌	细胞质
Alpha-lytic factor prosequence	产酶溶杆菌	细胞质
CaroxypeptidaseY prosequence	酿酒酵母	液泡中
周质分子伴侣		
PulS	革兰氏阴性细菌	细胞周质空间
RNA 分子伴侣		
StpA	大肠杆菌	细胞类核
H-NS	大肠杆菌	细胞类核
其他		
SecB	大肠杆菌	细胞质

11.3.1.4　分子内伴侣

分子伴侣一定不是最终组装完成的结构的组成部分，但不一定就是一个独立的实体，如一些蛋白水解酶的前序列以及一些核糖核蛋白体的加工前的部分对于这些酶的折叠和成熟是必需的，将它们称为分子内伴侣（intramolecular chaperone）。

这些位于信号肽和成熟蛋白之间的前序列，不仅能抑制酶原蛋白的活性，还作为分子伴侣帮助酶原蛋白折叠。去除前序列，剩余部分便会形成稳定的中间物，既不沉淀，也不折叠；加入前序列，才能折叠成活性构象。与一般的分子伴侣相比，分子内伴侣具有高度的专一性，通过水解作用释放，不需要 ATP。

11.3.1.5　分子伴侣结构上的共同特点

分子伴侣家族在结构上具有一些共同特点。

家族成员具有高度保守性　其中 Hsp70 家族是由一类高度保守的蛋白质组成，广泛分布于真核生物和原核生物中。在果蝇、酵母、鸡、哺乳动物、锥虫和细菌等生物细胞中检测

发现，甚至在具有最远亲缘关系的真核生物中的 Hsp70 的序列一致性也达到了 50%。而原核生物的分子伴侣 DnaK 与真核生物的分子伴侣 Hsp70 同源性也高达 50%。Hsp70 家族成员提供 ATP 结合位点的 N 端序列具有极高的保守性，而与底物蛋白质结合的 C 端序列变异性则很高，保证可与不同的蛋白质结合；Hsp60 家族中大肠杆菌细胞质分子伴侣 GroEL 与真核生物线粒体基质分子伴侣 cpn60 的同源性达到 60%。

图 11-13　Hsp60 家族蛋白的三维结构
（引自 Voet *et al*., 1995）

家族成员结构上具有相似性　Hsp70 家族成员都折叠成两个功能结合区域——ATP 结合域和底物结合域；结晶 X 射线分析和电镜观察 Hsp60 家族中 GroEL 与 cpn60 的结构，发现它们都是由 14 个分子质量 60kDa 的蛋白质亚基构成两个七元环，再堆叠形成圆筒状的十四聚体，中央形成空穴（图 11-13），推测空穴与它们帮助蛋白质折叠的功能有关，可能是提供折叠的场所；它们的辅助分子伴侣 GroES 和 cpn10 均由分子质量约 10kDa 的蛋白质亚基形成一个七元环，它们与 GroEL 或 cpn60 圆筒体的末端结合起辅助分子伴侣的作用。

组成型表达　家族成员大部分在体内为组成型表达，在刺激条件下会被进一步诱导。Hsp60、Hsp70、Hsp90 在细胞内含量丰富，正常情况下 GroEL 可占细胞总蛋白质含量的 1%～2%，热诱导下最高可达 10%～15%；cpn60 占线粒体基质蛋白质总量的 1%。也有例外，如 Hsp70 家族成员 Hsp72 只是诱导产物，正常情况下在细胞中含量很低。这与它们在细胞中所起的作用有关。

家族成员都具有可被底物激活和增强的弱 ATP 酶活性　这一特性与它们在作用过程中与 ATP 结合水解循环过程偶联有关，Hsp70 的 K^+ 依赖的 ATP 酶活性在它与底物结合时增加 2～20 倍。

11.3.2　分子伴侣的功能和作用机制

分子伴侣广泛存在于各种生物之中，在蛋白质合成、组装、转运和执行功能的过程中，特别是在逆境如高温等条件下起重要作用。

11.3.2.1　帮助蛋白质折叠和装配

这是所有分子伴侣家族成员共同的、最重要的功能。驱使蛋白质折叠和组装的主要作用力是蛋白质疏水区域间的疏水作用。蛋白质多肽链在核糖体上合成时就开始进行折叠。在体内溶液环境中，肽链形成天然构象或亚基装配成复合物之前，它们原来包埋在蛋白质中心的疏水区瞬间会暴露而易错误折叠或聚集形成不正确的产物；分子伴侣识别这些未折叠的肽链和未组装的亚基，与它们形成复合物防止错误折叠或聚集成包含体（图 11-14）。不同的分子伴侣识别机制和作用专一性不完全相同，如 Hsp70 家族惟一定位在内质网中的 Bip 蛋白就是

能够识别内质网蛋白的信号序列。

关于分子伴侣 GroEL-GroES 帮助蛋白质折叠的机制如图 11-15 所示，这一模型得到了实验的支持，并被普遍接受。

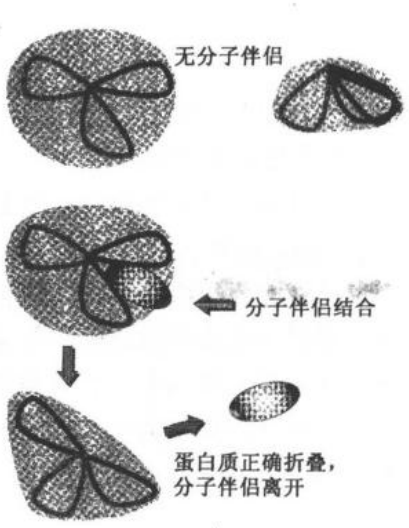


图 11-14　分子伴侣在蛋白质折叠和组装中的作用示意图（引自 Lewin，1997）

11.3.2.2　帮助蛋白质的转运和定位

关于蛋白质的转运和定位人们已建立了导肽和信号肽的概念，认为转运和定位信息存在于新生肽链 N 端的序列中，它们可与细胞器膜或质膜上的受体识别并结合，从而使蛋白质得以定向运输。分子伴侣在蛋白质的转运和定位中起很重要的作用，它们与新生肽链结合，阻止新生肽折叠成天然构象或聚集，使新生肽保持输出感受态的构象，即不折叠或部分折叠并且不被细胞内蛋白酶水解，利于跨膜转运。并且发现在新生肽链进入内质网的共翻译运输的模型中，肽链插入内质网膜除了与信号肽、信号肽识别颗粒和停泊蛋白有关外，还与分子伴侣有关。另外在网格蛋白包被小泡形成过程中也需要分子伴侣的帮助。

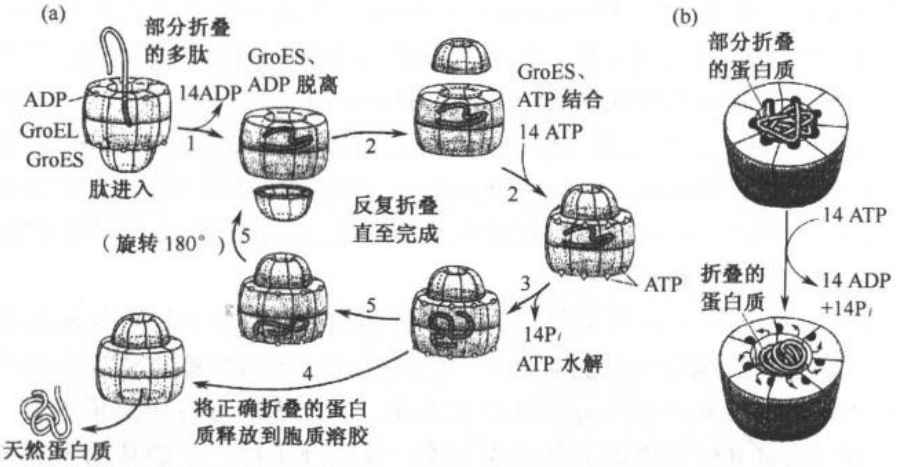


图 11-15　*E. coli* 分子伴侣 GroEL-GroES 在蛋白质折叠中的反应循环(引自 Voet *et al*.，1995)

(a) 1. 七元不对称 GroEL-GroES 复合物中的 GroEL（结合有 14 个分子 ADP）的中心穴与部分折叠的蛋白质结合，同时释放 GroES 和 14 个 ADP；2. GroEL 结合 14 个分子 ATP，从而减弱了 GroEL 与蛋白质的结合力；导致 GroEL 与 GroES 的重结合；3. 14 个 ATP 分子同时水解，GroEL 将结合的未折叠的多肽释放出来，使其进行正确折叠；4. 如果多肽折叠正确即可释放到胞质溶胶中；5. 如果折叠不正确，则重新经过上述循环再折叠。(b) 与 GroEL 多位点结合的部分折叠的多肽在 ATP 帮助下释放模型。ATP 结合及水解使多肽与 GroEL 脱离，并在分离的状态下进行折叠。

11.3.2.3 参与细胞器和细胞核结构的发生

真核细胞中叶绿体和线粒体蛋白是由核基因和细胞器基因共同编码的。核基因编码的蛋白质是在细胞质游离核糖体上合成，然后转运到叶绿体或线粒体。特别是线粒体的生物合成中，Hsp70 和 Hsp60 协同作用的结果是使线粒体蛋白定位后保持结构的完整和行使正确功能。Hsp70 在蛋白前体进入线粒体之前，使它们保持跨膜和对 Hsp60 的感受态；Hsp60 在此之后促进这些蛋白折叠和组装成寡聚体构象，完成整个运输装配过程。

分子伴侣在核小体的装配中起重要作用。核质蛋白是第一个被确定的分子伴侣，这种酸性可溶蛋白在核中带负电，它只与组蛋白结合，不与 DNA 或其他装配好的核小体结合。目前认为核质蛋白的负电荷中和组蛋白上正电荷，降低组蛋白电性，减少 DNA 和组蛋白因离子作用引起的错误装配。

11.3.2.4 应激反应

分子伴侣中除少数成员外，大部分成员均可被高温或低温和乙醇、亚砷酸盐、重金属等非温度因素诱导合成，它们使生物体逆境耐受力大大增强。大肠杆菌中 *DnaK* 基因缺失严重地降低了细胞在 30℃的生长速度，在 40℃则生长完全被抑制。野生型的大肠杆菌在 42℃条件下预处理 5min 将明显提高菌株在 50℃条件下的存活率。酵母 *Hsp104* 基因突变体暴露在 50℃下几分钟其死亡的速率是野生型细胞的 100～1 000 倍，同时这种突变体对乙醇的耐受力下降了 1 000 倍。用人类组成型表达的 *Hsp70* 基因转化的鼠细胞和猴细胞，明显提高了耐热能力。对于热激蛋白在热激反应（heat shock response）中的作用机制已研究得比较深入，但还不能准确描述其中关键的生物过程。免疫荧光标记法确定真核生物的 Hsp70 集中于膜上、核质和核仁中，同时在酵母无细胞提取液中纯化的 Hsp70 可以修复因热诱导被破坏的核功能如 mRNA 的剪接。热激后的果蝇属（*Drosophila*）生物组成型表达的 Hsp70 可以加快核形态的恢复，对脊椎动物进行微注射 Hsp70 可使 mRNA 在短时热激条件下存活能力提高。热处理主要是破坏 mRNA、rRNA 合成和蛋白质的合成与降解。由此可见分子伴侣在热激反应中的作用首先是恢复细胞转录和翻译的机能。

Sherman 和 Goldberg 等人的研究结果表明分子伴侣 DnaK 等不仅可与变性蛋白结合，阻止它们聚集，还作为蛋白酶酶解的识别要素，使被破坏的蛋白质能被快速降解掉，减少了被破坏蛋白质与功能蛋白质间发生有害作用的可能性，防止不溶蛋白质聚集积累，同时无功能蛋白质释放的游离的氨基酸可供新蛋白质的合成。说明分子伴侣不能帮助未折叠的中间物获得正确的折叠途径时，它们就加速中间物的降解，保证体内环境的稳定。

11.3.2.5 参与信号转导

分子伴侣在信号转导中也有重要作用。

研究证明，一些脂溶性信息分子在细胞质中的受体有 3 个功能部位：激素结合位点（hormone binding site）、DNA 结合结构域（DNA binding domain）以及核定位（nuclear localization）位点，受体本身就是核定位蛋白。当细胞未受到激素刺激时，受体是同伴侣蛋白结合在一起的，核定位信号和 DNA 结合位点都被隐蔽起来。当细胞受到信号分子作用（如激

素），脂溶性的激素进入细胞质，同相应受体上的激素结合位点结合，使受体同伴侣蛋白脱离，露出核定位信号和 DNA 结合位点。然后，核定位蛋白通过核孔进入细胞核，DNA 结合位点同染色体上的 DNA 结合，启动基因的表达。

例如糖皮质（激）素受体（glucocorticoid receptor，GR），其本身就是一个基因表达的调节蛋白，在没有激素作用时，同 Hsp90 结合，存在于细胞质中。当细胞受到激素作用后，激素进入细胞质，并同受体结合，使之与伴侣蛋白分开，这样，受体可进入细胞核调控基因的表达（图 11-16）。

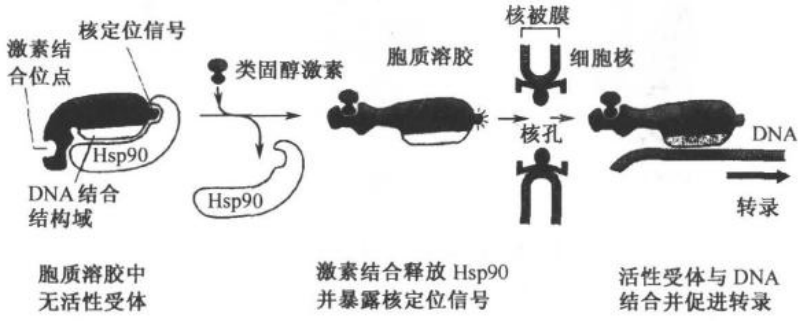


图 11-16　分子伴侣 Hsp90 在信号转导中的作用（引自 Alberts *et al*.，1994）

11.4　染　色　质

所谓染色质（chromatin）最早是 1879 年 Flemming 提出的用以描述核中染色后强烈着色的物质。现在认为染色质是细胞间期细胞核内能被碱性染料染色的物质。主要是由 DNA 和蛋白质组成的复合物。

染色体（chromosome）是细胞在有丝分裂和减数分裂过程中由染色质聚缩而成的棒状结构。染色体和染色质在化学本质上没有差异，只是在构型上不同，是遗传物质在细胞周期不同阶段的不同表现形式。

11.4.1　染色质 DNA

除少数 RNA 病毒外，DNA 几乎是所有生物遗传信息的携带者，是遗传信息的一级载体。在真核生物中，每个 DNA 分子都被包装到染色体中，一个生物储存在单倍体染色体组中的总遗传信息称为该生物的基因组（genome）。

11.4.1.1　DNA 的 3 种构型

染色质中的 DNA 是双螺旋结构，在构型上，主要是 Watson 和 Crick 提出的右手双螺旋 DNA，即 B 型 DNA。但是 DNA 分子不仅具有一级结构的多样性，还具有二级结构的多态性（polymorphism）。除了 B 型 DNA 外，还有 A 型和 Z 型 DNA（图 11-17）。

B 型 DNA（B-form DNA）是右手双螺旋的 DNA，也是最稳定的 DNA。但是在不同的条

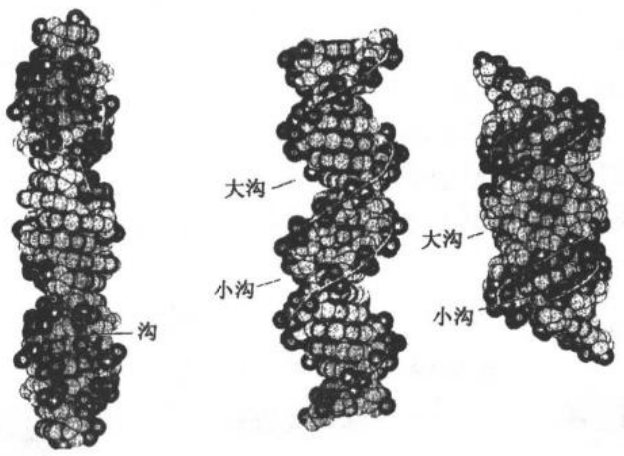


图 11-17　3 种不同构型的 DNA

件下，DNA 的构型会发生变化，呈现结构的多形性。A 型 DNA 是另一种右手双螺旋的 DNA，它与 B 性 DNA 的主要差别在于 DNA 的大沟和小沟有所不同，此外，A 型 DNA 更紧密，每螺旋 11 对碱基，螺距为 2.53nm。

左手双螺旋 DNA，即 Z 型 DNA 是用 X 射线晶体衍射法分析人工合成的小片段 DNA 的晶体时发现的，在构型上与 B 型 DNA 有很大的不同（表 11-3），并很可能与癌变有关。

表 11-3　A、B 和 Z 型 DNA 的比较

主要特征	A 型	B 型	Z 型
分子外形	短粗	居中	细长
螺旋方向	右手	右手	左手
每碱基对垂直高度/nm	0.26	0.34	0.37
螺距/nm	2.53	3.54	4.56
螺旋直径/nm	2.55	2.0	1.84
每圈螺旋碱基对	11	10.5	12
碱基倾角/（°）	20	6	7
大沟	窄而极深	宽而略深	平坦
小沟	很宽而浅	窄而略深	很窄而深

11.4.1.2　DNA 序列的复杂性

真核生物的 DNA 组织结构比较复杂，根据 DNA 的复性动力学研究，可把 DNA 的序列分为单一序列和重复序列。

单一序列（unique sequence）　又称非重复序列，在一个基因组中一般只有一个拷贝。真核生物的绝大多数结构基因在单倍体中是单拷贝或几个拷贝（1～5 个拷贝）。

重复序列（repetitive sequence）　拷贝数在 10 个以上的序列称为重复序列。根据基因的重复程度，可以分为两类：中度重复序列，重复次数在 $10^2 \sim 10^5$ 之间，如组蛋白基因和 rRNA 基因均属此类，虽然都能转录，但除了组蛋白基因外，其他基因都不能翻译。重复次数在 10^5 以上的称高度重复序列。高度重复序列 DNA 通常由简单的核苷酸序列组成，分布在染色体的着丝粒区和端粒区。

卫星 DNA 是高度重复序列中 AT 含量很高的简单的高度重复序列。由于 AT 段浮力密度小，所以在 DNA 片段进行 CsCl 密度梯度离心时，常会在 DNA 主带上有一个次要的带相伴随，因此称为卫星 DNA。

11.4.1.3　DNA 结构稳定遗传的功能序列

DNA 是遗传物质，它的稳定遗传依赖于复制和分离的准确性。真核生物进行有丝分裂和减数分裂时，首先要进行染色体复制，然后均等分配到两个子细胞中。根据近年来的研究发现，要达到这个目的，在染色体上必须具有 3 个功能单位，即：自主复制序列（autonomously replicating sequence，ARS）、着丝粒序列（centromeric sequence，CEN sequence）和端粒序列（telomeric sequence，TEL sequence）（图 11-18）。

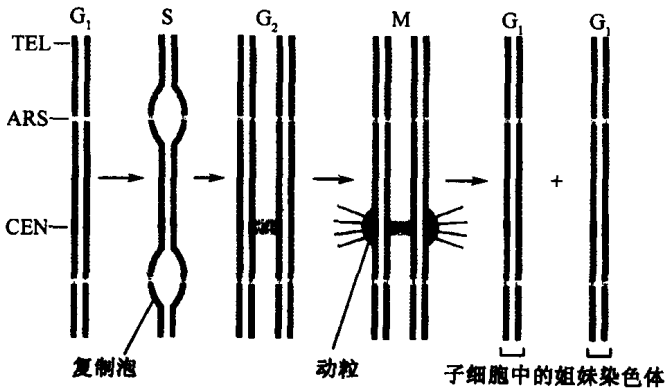


图 11-18　染色体稳定遗传的三种功能序列（引自 Alberts *et al.*，1994）

ARS 序列　即自主复制序列，又叫复制起点序列（replication origin sequence），是顺式作用元件的一种。这种序列是染色体正常起始复制所必需的。所有的 ARS 的 DNA 均有一段保守序列：200bp-A（T）TTTAT（C）A（G）TTTA（T）-200bp，真核生物染色体上有多个 ARS 序列。上下游各 200bp 左右的序列是维持 ARS 功能所必需的。

CEN 序列　即着丝粒序列，是真核生物在有丝分裂和减数分裂时，两个姐妹染色单体附着的区域，含有 11 个高度保守的碱基序列：-TGATTCCGAA-，功能是形成着丝粒，均等分配两个子代染色单体。

TEL 序列　是线性染色体两端的特殊序列，这种序列广泛存在于原生动物、真菌、植物和哺乳动物的染色体中，并且在序列组成上十分相似，富含 G，且由短的基本序列随机串联重复而成。在人类，这种基本序列是-GGGTTG-。功能是保持线性染色体的稳定，即不环化、不黏合、不被降解。端粒是由端粒酶合成的。该酶是反转录酶，自身含有一个 RNA 分子，可作为延长 DNA 末端合成的模板，合成的方向是 5′→3′（图 11-19）。

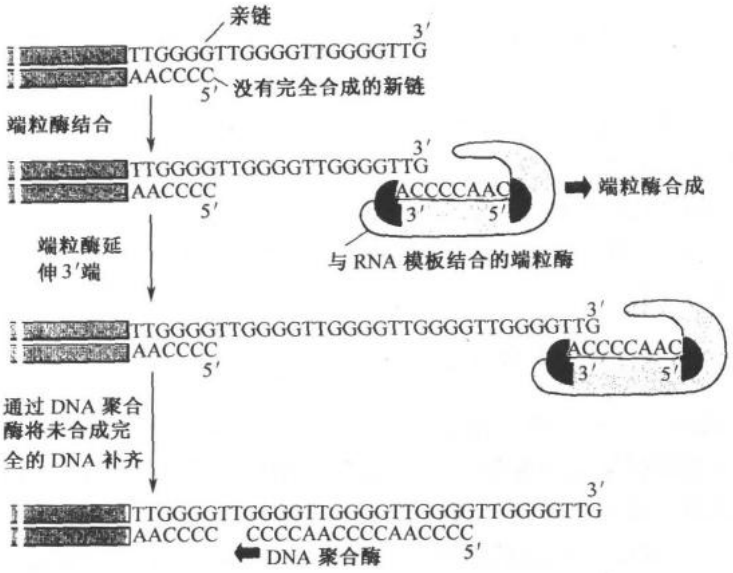


图 11-19　端粒酶介导的端粒合成（引自 Alberts *et al*.，1994）

端粒酶是一种蛋白质和 RNA 的复合物，用自身的 RNA 作为模板，反转录成 DNA，使 DNA 链不断加长，然后在 DNA 聚合酶的作用下将 DNA 双链中的未合成的缺口填补。

端粒是染色体的重要部分，它保证了染色体的完全复制；同时在染色体的两端形成保护性的帽结构，使染色体的 DNA 免受核酸酶和其他不稳定因素的破坏和影响。另外，端粒的形成使染色体的末端不会与其他染色体末端融合。

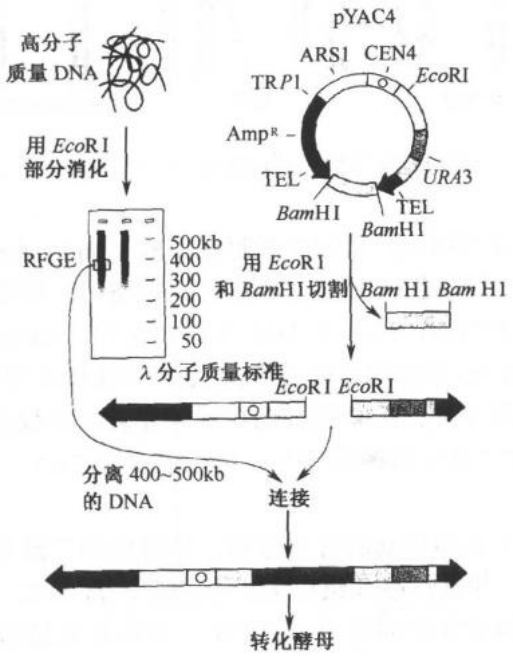


图 11-20　酵母人工染色体的构建

11.4.1.4 人工染色体

在基因工程中，由于一般的载体是环状结构，容载能力有限，要克隆大的基因比较困难。基于 ARS、CEN、TEL 是线性染色体稳定的功能序列，人们利用这些序列构建载体，重组后的 DNA 以线性状态存在，这样不仅稳定，而且大大提高了插入外源基因的能力，并且可以像天然染色体一样在寄主细胞中稳定复制和遗传，故称为人工染色体（artificial chromosome）。如利用从酵母染色体上分离的 ARS、CEN、TEL 序列构建载体，然后用这种载体构建的染色体即称为酵母人工染色体（图 11-20）。

11.4.2 组 蛋 白

11.4.2.1 组蛋白的类型和性质

组蛋白（histone）是真核生物染色体的基本结构蛋白，是一类小分子碱性蛋白质，有 5 种类型：H1、H2A、H2B、H3、H4（表 11-4），它们富含带正电荷的碱性氨基酸，能够同 DNA 中带负电荷的磷酸基团相互作用。

组蛋白的基因非常保守。亲缘关系较远的种属中，4 种组蛋白（H2A、H2B、H3、H4）氨基酸序列都非常相似，如海胆组织 H3 的氨基酸序列与来自小牛胸腺的 H3 的氨基酸序列间只有一个氨基酸的差异，小牛胸腺的 H3 的氨基酸序列与豌豆的 H3 也只有 4 个氨基酸不同。不同生物的 H1 序列变化较大，在某些组织中，H1 被特殊的组蛋白所取代。如成熟的鱼类和鸟类的红细胞中 H1 则被 H5 所取代，精细胞中则由精蛋白代替组蛋白。染色质中的组蛋白与 DNA 的含量之比为 1:1。

表 11-4 5 种主要类型的组蛋白

类 型	赖氨酸/%	精氨酸/%	氨基酸数/个	分子质量/Da
H1	29	1	215	23 000
H2A	11	9	129	14 000
H2B	16	6	125	13 800
H3	10	13	135	15 300
H4	11	14	102	11 200

11.4.2.2 组蛋白的功能

5 种组蛋白在功能上分为两组：一组是核小体组蛋白（nucleosomal histone），包括 H2A、H2B、H3 和 H4，这 4 种组蛋白分子质量较小（102～135 个氨基酸残基），它们的作用是将 DNA 分子盘绕成核小体。它们没有种属及组织特异性，在进化上十分保守，特别是 H3 和 H4 是所有已知蛋白质中最为保守的。H1 属于另一组组蛋白，它不是核小体的核心组蛋白，在构成核小体装配中起连接作用，并赋予染色质以极性。H1 有一定的组织和种属特异性。H1 的分子质量较大，有 215 个氨基酸残基，在进化上也较不保守。

11.4.2.3 组蛋白的化学修饰

虽然组蛋白分子的氨基酸序列是高度保守的，但在组蛋白的分子结构中也会见到一些变

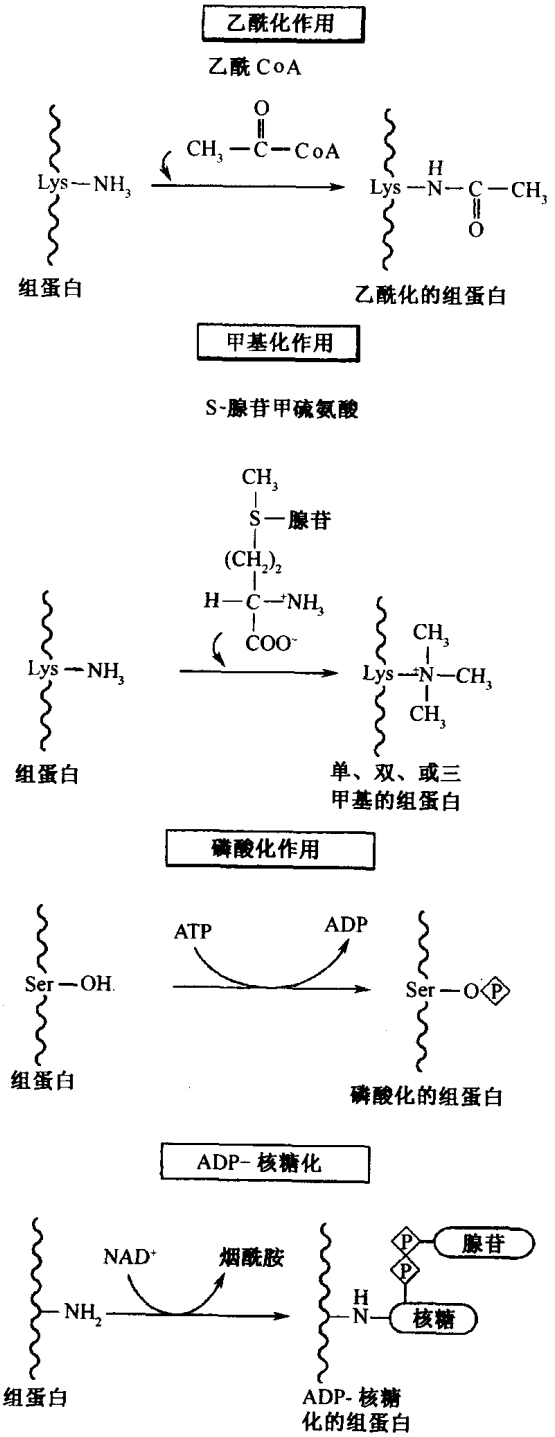


图 11-21 组蛋白的修饰作用（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

化，例如 H1 能够以多种形式存在，每一种形式中的氨基酸都有一定的变化。大多数细胞中都有部分组蛋白的某些碱性氨基酸侧链被磷酸化、乙酰化或甲基化以及 ADP 的核糖化等修饰（图 11-21），这些修饰中和了侧链的正电荷或使侧链带负电。

11.4.3 非组蛋白

非组蛋白（nonhistone）是指细胞核中组蛋白以外的蛋白质。非组蛋白不仅包括以 DNA 作为底物的酶，也包括作用于组蛋白的一些酶，如组蛋白甲基化酶（表 11-5）。此外还包括 DNA 结合蛋白、组蛋白结合蛋白和调控蛋白，其中最丰富的一类是高速泳动族蛋白（high-mobility group protein，HMG protein）。由于非组蛋白常常与 DNA 或组蛋白结合，所以在染色质或染色体中也有非组蛋白的存在，如染色体骨架蛋白。

表 11-5 某些具有酶功能的非组蛋白

酶	功 能
以核酸作为底物的酶	
DNA 聚合酶	DNA 合成
RNA 聚合酶	RNA 合成
核酸酶	切割 DNA 和（或）RNA
DNA 连接酶	在 DNA 复制和修复时进行 DNA 连接
polyA 聚合酶	在 mRNA 3′端添加 poly A 尾
DNA 甲基化酶	DNA 甲基化
拓扑异构酶	将超螺旋 DNA 转变成松弛型
螺旋去稳定酶类	DNA 解旋，形成稳定的单链
作用于染色质蛋白的酶	
蛋白酶	蛋白质切割
组蛋白乙酰化与去乙酰化酶	组蛋白乙酰化和去乙酰化
蛋白激酶	组蛋白和非组蛋白的磷酸化
组蛋白甲基化酶	组蛋白甲基化

11.4.3.1 非组蛋白的特性

非组蛋白是一类不均一的蛋白质，约有 500 多种不同的组分。非组蛋白所含酸性氨基酸超过碱性氨基酸，故呈酸性，带负电荷。另外，非组蛋白常常是被磷酸化的。由于非组蛋白具有调控作用，所以它们是异质性的，具有组织特异性和发育阶段的特异性，且在活性染色质中的含量要比在非活性染色质中的含量高。有些非组蛋白是特异的转录调控因子，参与基因的选择性转录表达。

非组蛋白在整个细胞周期中都能合成，并且合成的时间是在 DNA 合成之前，在细胞质中合成后就被转移到细胞核中。

非组蛋白在作用时具有以下特性：①能识别特异的 DNA 序列，识别的信息来源于 DNA

核苷酸序列的本身，识别位点存在于 DNA 双螺旋的大沟部分；②识别与结合靠氢键和离子键，而非共价键；③在不同的基因组文库之间发现这些序列特异性结合蛋白所识别的 DNA 序列在进化上是保守的。

11.4.3.2 非组蛋白的功能

组蛋白在各种类型细胞中的浓度基本是相同的，而非组蛋白在不同的细胞中不仅种类而且浓度也不相同，正是非组蛋白的差异调节着不同的基因表达。非组蛋白的功能是多种多样的，有些是酶，有些是反式作用因子，有些则是结构蛋白。

参与染色体的构建 这方面的作用与组蛋白相辅佐。组蛋白把 DNA 双链分子装配成核小体串珠结构后，非组蛋白则帮助折叠、盘曲，以形成在复制和转录功能上相对独立的结构域（图 11-22）。

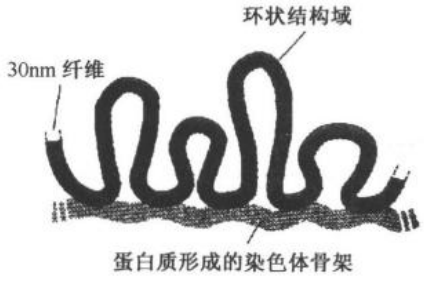


图 11-22 非组蛋白在染色体构建中的作用（引自 Alberts *et al*., 1994）

启动基因的复制 这些蛋白质往往以复合物的形式结合在一段特异 DNA 序列上，复合体中包括启动蛋白、DNA 聚合酶、引发酶等，作用在于启动和推进 DNA 分子的复制。

调控基因的转录 这些蛋白一般为基因调控蛋白（gene regulatory protein），它们往往以竞争性或协同性结合的方式，作用于一段特异 DNA 序列上，即多种蛋白分子或一种蛋白的多个分子间存在着竞争或协同的关系，以调节有关基因的表达。

11.4.3.3 序列特异性 DNA 结合蛋白的结构特征

根据近几年的研究发现，参与基因表达调控的序列特异性结合的非组蛋白可分为几种不同的蛋白质家族，具有不同的与 DNA 结合的结构域（图11-23）。

锌指结构基序（zinc finger motif） 这类蛋白因子往往含有几个相同的指结构，每一个指结构含有以下的保守序列：-Tyr/Phe-X-Cys-$X_{2\sim4}$-Cys-X_3-Leu-X_2-His-$X_{3\sim4}$-His-，其中 X 可以是任何氨基酸。这段保守序列中的 2 个半胱氨酸残基和 2 个组氨酸残基与锌离子形成配位键，形成环，因此称为锌指，上述具有 Cys 和 His 的指结构称为 Cys_2/His_2 指。每个指结构有 23 个氨基酸残基，指结构之间的距离为 7～8 个氨基酸残基。

另一类指结构是 Cys_2/Cys_2 的锌指结构，指结构中保守序列是：-Cys-X_2-Cys-X_{13}-Cys-X_2-Cys-。

螺旋-转角-螺旋基序（helix-turn-helix motif） 这是最早在原核基因的激活蛋白和阻遏蛋白中发现的调控蛋白，是一类同型二聚体。构成同型二聚体的每个单体由 20 个氨基酸的小肽组成螺旋-转角-螺旋结构，其中一个螺旋为识别螺旋（recognition helix），负责识别 DNA 大沟的特异碱基序列。另一个螺旋没有碱基特异性，与 DNA 磷酸戊糖链骨架接触。在与 DNA 特异结合时，以二聚体形式发挥作用，结合靠蛋白质的氨基酸侧链与特异碱基对之间形成氢键。

亮氨酸拉链基序（leucine zipper motif） 这类蛋白质都是含有 4 个或 5 个亮氨酸残基，

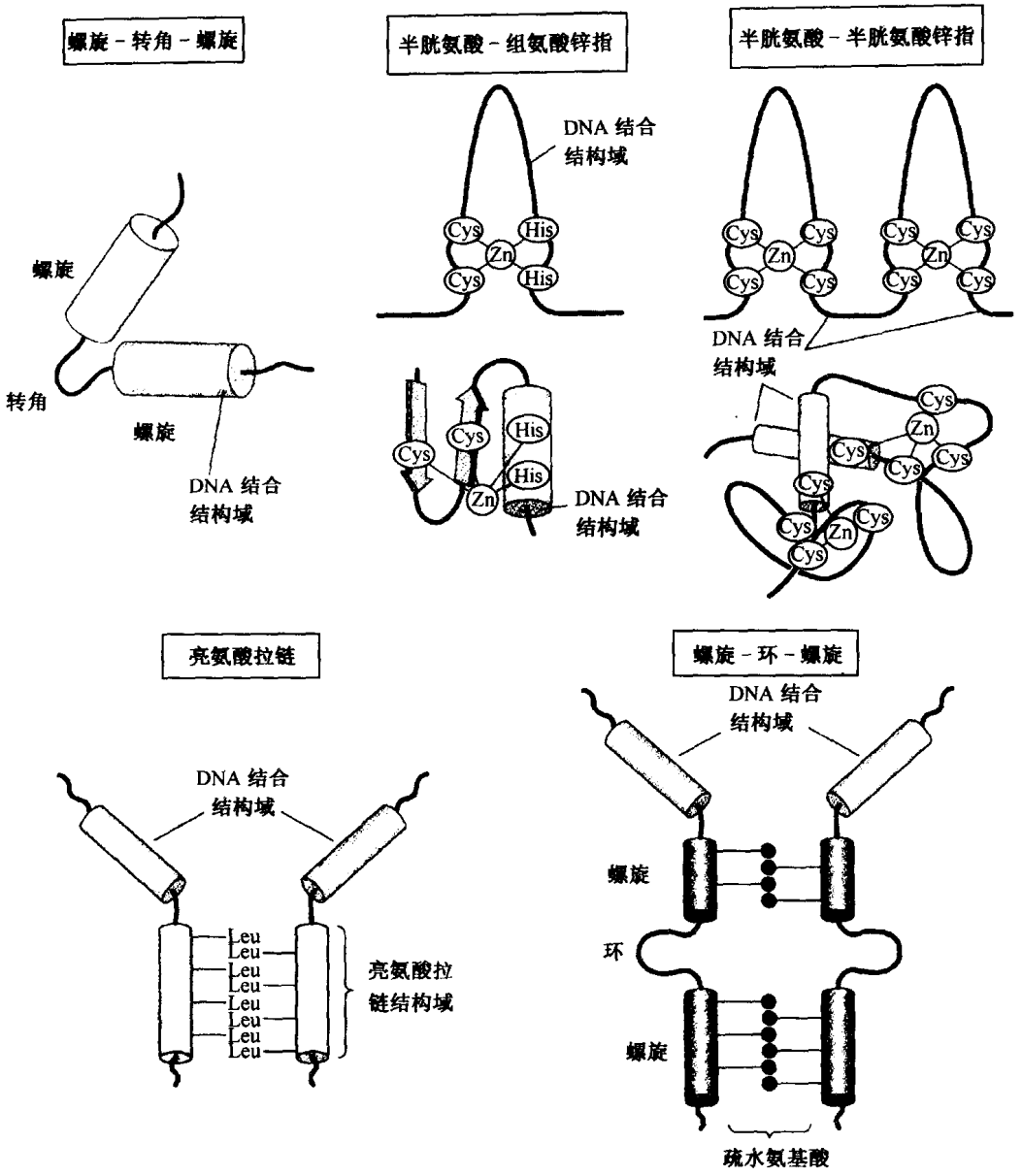


图 11-23　几种主要序列特异性 DNA 结合蛋白的结构特征（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

彼此之间精确的相距 7 个氨基酸残基。这样，在 α 螺旋的每一个侧面出现一个 Leu，这些 Leu 排成一排，两个蛋白质分子的 α 螺旋之间靠 Leu 残基之间的疏水作用形成一条拉链。这类蛋白质与 DNA 的特异性结合都是以二聚体形式起作用的，但与 DNA 结合的结构域并不在拉链区。

螺旋-环-螺旋基序（helix-loop-helix motif）　这种结构是由一个环将两个螺旋结构分隔开来，与螺旋-转角-螺旋结构的差别在于：它的两个螺旋的一侧还有一段疏水链，这样当螺旋-环-螺旋结构位于两个多肽之间时，这两个疏水的侧链就会将两个多肽链连在一起形成类似亮氨酸拉链的结构。

11.4.3.4 反式作用因子和顺式作用元件

上面介绍的是非组蛋白参与基因表达调控的特殊结构，实际上，这些蛋白质是作为反式作用因子在起作用的，DNA 上的位点就是顺式作用元件（图 11-24）。

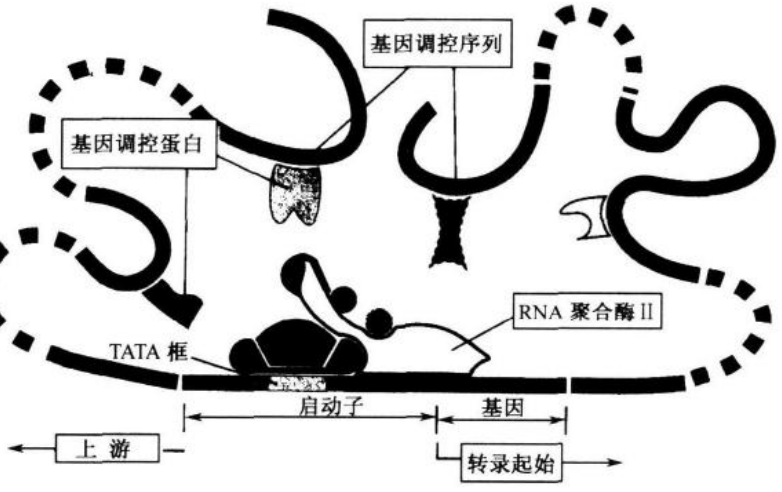


图 11-24 顺式作用元件与反式作用因子相互作用与基因转录起始复合物的形成
（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

反式作用因子（*trans*-acting factor） 参与基因表达调控的蛋白质因子，它们与特异的靶基因的顺式元件结合起作用。编码反式作用因子的基因与被反式作用因子调控的靶序列（基因）不在同一染色体上。反式作用因子有两个重要的功能结构域：DNA 结合结构域和转录活化结构域，它们是其发挥转录调控功能的必需结构。反式作用因子可被诱导合成，其活性也受多种因素的调节。

同一类序列特异性的反式作用因子由多基因家族所编码，它们具有特定的蛋白质结构（如上述的锌指结构、碱性亮氨酸拉链、螺旋-环-螺旋基序等）和蛋白质结构上的同源性，因而构成反式作用因子家族，如类固醇激素受体家族、AP1 家族等。

顺式作用元件（*cis*-acting element） 存在于基因旁侧序列中能影响基因表达的序列。顺式作用元件包括启动子、增强子、负调控序列和可诱导元件等，它们的作用是参与基因表达的调控。顺式作用元件本身不编码任何产物，仅仅提供一个作用位点，要与反式作用因子相互作用而起作用。图 11-24 所示是基因转录起始所涉及的顺式作用元件与反式作用因子及其相互作用。

11.4.4 异染色质和常染色质

11.4.4.1 异固缩

细胞分裂时，核内染色质要凝缩成染色体结构，对碱性染料着色很深，一旦脱离分裂期，染色体去凝集成松散状态，此时染色着色力减弱。但是，有些染色体或其片段的凝缩周期与

其他的不同，这种现象称为异固缩（heteropythosis）。其中在间期或前期过度凝缩，染色很深的称为正异固缩；在中期凝缩不足，染色很浅，称为负异固缩。

11.4.4.2 异染色质和常染色质

根据染色体在分裂期与间期的染色不同，分为异染色质（heterochromatin）和常染色质（euchromatin）。

在有丝分裂完成之后，大多数高度压缩的染色体要转变成间期的松散状态。但是，大约有 10% 的染色质在整个间期仍然保持压缩状态，将这种染色质称为异染色质，而将回复到松散状态的染色质称为常染色质。异染色质和常染色质可通过染色进行观察（图 11-25），间期染色深的是异染色质，染色浅的是常染色质。

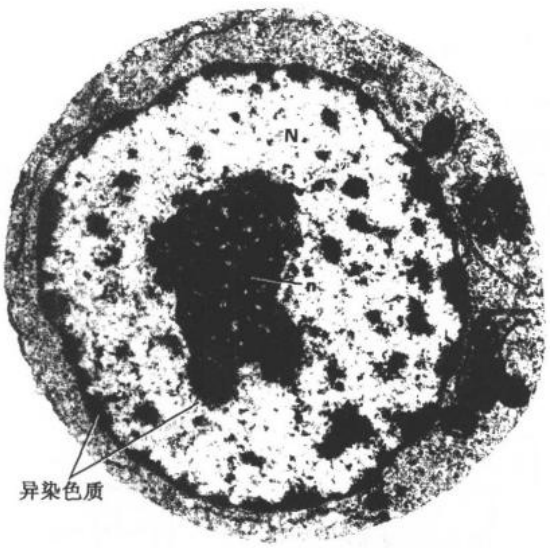


图 11-25 骨髓干细胞超薄切片的电子显微镜照片（引自 Lodish *et al.*，1999）
图中的 N 和 n 分别表示细胞核和核仁，核仁外染色深的区域是异染色质。

当用［^{3}H］标记的尿嘧啶作为细胞合成 RNA 的前体，然后进行细胞固定、切片和放射自显影分析，发现异染色质不能被标记，表明它们可能没有转录活性。不过，现已发现某些基因位于异染色质区。另外，也并非所有无活性的基因和不转录的 DNA 区，都是异染色质区。

异染色质又被分为两类：结构性异染色质和兼性异染色质。

组成性异染色质（constitutive heterochromatin）是指各种类型细胞中在整个细胞周期内都处于凝聚状态的染色质，即永久性的呈现异固缩的染色质。组成性异染色质含有高度重复的随体 DNA，分布于大多数染色体的着丝粒区、端粒和次缢痕处，呈现 C 带染色。组成性异染色质的 DNA 主要是高度重复顺序，含有的基因相当少。事实上，当一个有活性的基因通过转座或转位，移动到组成性异染色质区，通常要失去活性，这种现象称为位置效应（position effect），因此认为组成性异染色质区含有抑制邻近基因表达的成分。

兼性异染色质（facultative heterochromatin）是指在一定的细胞类型或一定的发育阶段呈

现凝聚状态的异染色质。在一定时期的特种细胞的细胞核内，原来的常染色质可转变成兼性异染色质。如雄性细胞含有一个瘦小的 Y 染色体和一个大的 X 染色体，由于 X 和 Y 染色体上很少有共同的基因，对于雄性来说，X 染色体上的基因就只有一个拷贝。虽然雌性细胞有两条 X 染色体，也只有一条具有转录活性，另外一条 X 染色体像异染色质一样保持凝缩状态，称为巴氏小体（Barr body）。巴氏小体的形成保证了雄性和雌性都只有一条具有活性的 X 染色体，合成等量的 X 连锁基因编码的产物。

X 染色体的异染色质化又称为 X 失活（X-inactivation），是近年来的一个研究热点，1992 年开始注意其机理的研究，发现 X 失活是由 RNA 引起的。

11.4.5 染色质的基本结构——核小体

在 20 世纪 70 年代初期，用非特异性的核酸酶处理染色质，发现大多数 DNA 都会形成长度为 200bp 的片段（图 11-26）。如果用同样的核酸酶处理裸露的 DNA，产生随机大小的 DNA 片段。据此推测染色体 DNA 中除了某些位点外，都得到了保护，使核酸酶不能随机切割，并推测这种保护作用与 DNA 结合的蛋白质有关。1974 年，美国哈佛大学的 Kornberg 根据这些结果以及其他的研究进展，提出 DNA 和组蛋白组成重复的亚单位：核小体（nucleosome）。

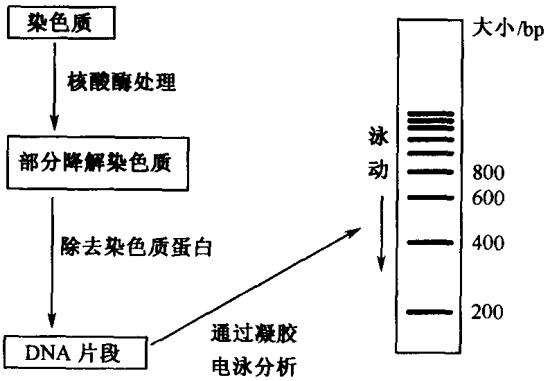


图 11-26 染色质的核酸酶水解实验（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）
实验中用核酸酶水解从大鼠肝细胞中分离的染色质，然后用电泳分析 DNA 片段长度。

11.4.5.1 核小体的结构特点

核小体又称为核体、核粒，是染色质的基本结构单位。由 200 个左右（160～240）碱基对的 DNA 和 5 种组蛋白结合而成。其中 4 种组蛋白（H2A、H2B、H3、H4）各 2 分子组成八聚体的小圆盘，是核小体的核心结构。146 个碱基对的 DNA 在小圆盘外面绕 1 $\frac{3}{4}$ 圈。每一分子的 H1 与 DNA 结合，锁住核小体 DNA 的进出口，起稳定核小体结构的作用。两相邻核小体之间以连接区 DNA（linker DNA）相连（图 11-27），连接区 DNA 的长度变化不等，因不同的种属和组织而异，但通常是 60bp。

用低离子浓度的溶液（如 0.7% NaCl）处理染色质，可选择性地除去组蛋白 H1。用电子

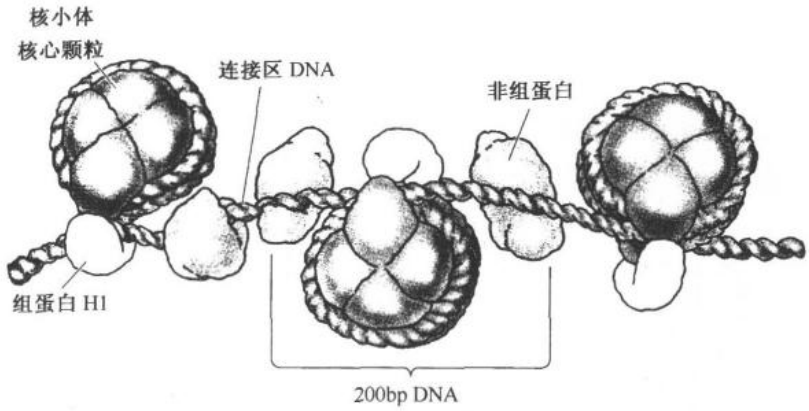


图 11-27　核小体的结构（引自 Cooper，2000）

显微镜观察用盐处理的染色质时，可见到核小体核心颗粒和连接区 DNA 是分开的，看起来似绳珠结构（beads on a string）（图 11-28）。

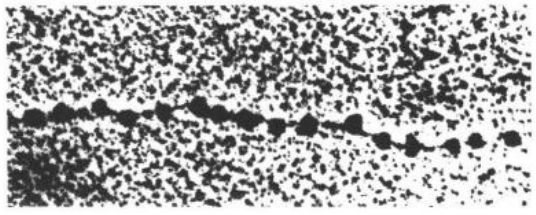


图 11-28　分离的 10nm 染色质纤维显示的绳珠结构（引自 Kleinsmith *et al*.，1995）

近年来，通过 X 射线晶体衍射法，对核小体的结构有了深入的了解。8 个组蛋白组成 4 个异源二聚体：两个 H2A-H2B 二聚体和两个 H3-H4 二聚体。两个 H3-H4 二聚体相互结合在中央形成四聚体。两个 H2A-H2B 二聚体位于 H3-H4 四聚体的外侧。4 个异源二聚体中的每一个二聚体都同约 30 个碱基对结合。组蛋白与 DNA 的结合可通过两种键介导：① DNA 骨架中带负电的磷酸和组蛋白中带正电的赖氨酸和精氨酸之间的离子键；②DNA 骨架和多肽骨架或侧链氨基酸之间的氢键。

有几种因素影响核小体在 DNA 中的定位。如与 DNA 特异位点结合的非组蛋白能够影响邻近核小体的位置。DNA 围绕组蛋白核心弯曲也是影响核小体定位的一个因素，因为组蛋白核并不是随机地与 DNA 结合，而是与 DNA 小沟的 AT 丰富区结合（图 11-29），为什么会这样，目前还没有明确的答案。推测，DNA 围绕组蛋白的包装需要进行紧密压缩，而两或三个 A-T 对的结合对于 DNA 的压缩可能更为容易。由此看来，核小体通常位于 A-T 丰富和 G-C 丰富区分布最合适的地方。

另外，某些核小体在 DNA 上的精确定位需要一些其他蛋白的帮助，并已经在一些生物中发现了一些帮助核小体形成的蛋白质。核小体在 DNA 中的精确定位对于某些真核生物的基因表达具有十分重要的作用。

11.4.5.2　核酸酶超敏感位点

核酸酶超敏感位点（nuclease-supersensitive site）是染色质 DNA 中对 DNase Ⅰ表现出高度敏感的区域（图 11-30），缺少核小体。这种区域通常很短，最长也不过几百碱基对。该位点含有特异的 DNA 序列，为特异性 DNA 结合蛋白所识别，因此，它参与了基因表达的调控。

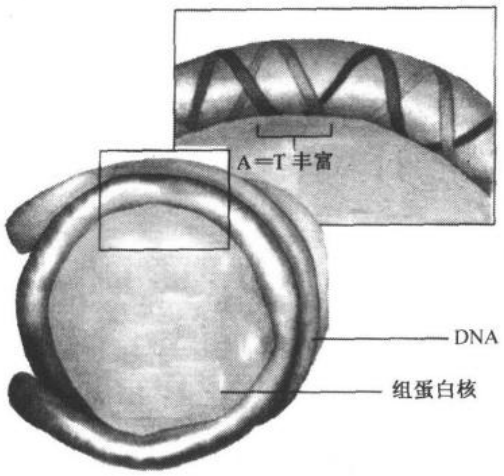


图 11-29　核小体在 DNA 中的定位
（引自 Nelson *et al*., 2000）
组蛋白在 DNA 的 A-T 富集和 G-C 富集区分布适宜的部位，通过与 A-T 的结合形成八聚体的核。

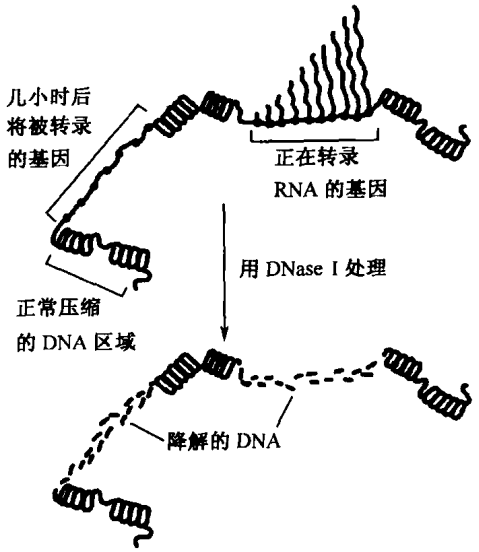


图 11-30　用 DNase I 消化染色质检测敏感区
（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）
DNase I 首先在核酸酶超敏感区切割 DNA(未示出)，然后降解所有正在转录的基因以及已被激活但尚未转录的基因。

另外，处于活性转录的区域对核酸酶也十分敏感。

11.4.5.3　核小体与 DNA 的复制

在细胞周期中，需要合成几乎与新合成的 DNA 等量的组蛋白参与染色质的装配，因此，大多数生物具有多拷贝的组蛋白基因，如脊椎动物的细胞中有 20 套 5 种组蛋白基因。与其他蛋白质不同，组蛋白主要是在 S 期合成的，此时的组蛋白 mRNA 水平很高，但 DNA 在 S 期合成停止之后，组蛋白的 mRNA 就变得非常不稳定，几分钟之内就会降解。但组蛋白本身是非常稳定的，在整个细胞生活期内都具有活性。

一旦组蛋白和 DNA 装配成核小体，组蛋白基本上不再与所结合的 DNA 分开。在 DNA 复制时，核小体也不会完全解体。离体研究表明，在 DNA 复制时，组成核小体的八聚体的组蛋白进行部分解离，其中 $(H3\text{-}H4)_2$ 四聚体在一起，并且在两条子代双链上随机分布。与此相反，原核小体中的 H2A-H2B 则是以两个二聚体存在，并相互分离，且随机与子代双链上原或新合成的 $(H3\text{-}H4)_2$ 四聚体结合组成核小体。

11.4.5.4　核小体与 DNA 的转录

现有的研究证明，即使正在转录的基因仍然有核小体结构，表明转录并不要求整个基因都处于无核小体状态。

由于核小体与 DNA 结合得很紧并且相当稳定，那么，在 DNA 进行转录时，核小体是否解体？一般认为，在某些情况下，如两栖类卵子发生时 rRNA 基因转录是非常活跃的，此时的核小体似已解体。但是大多数基因转录时核小体都是存在的。有人通过体外实验提出卷轴

模型（spooling model），在该模型中，在DNA转录时，核小体是全保留的，通过“DNA成环机制”（DNA looping mechanism），使RNA聚合酶通过核小体（图11-31）。

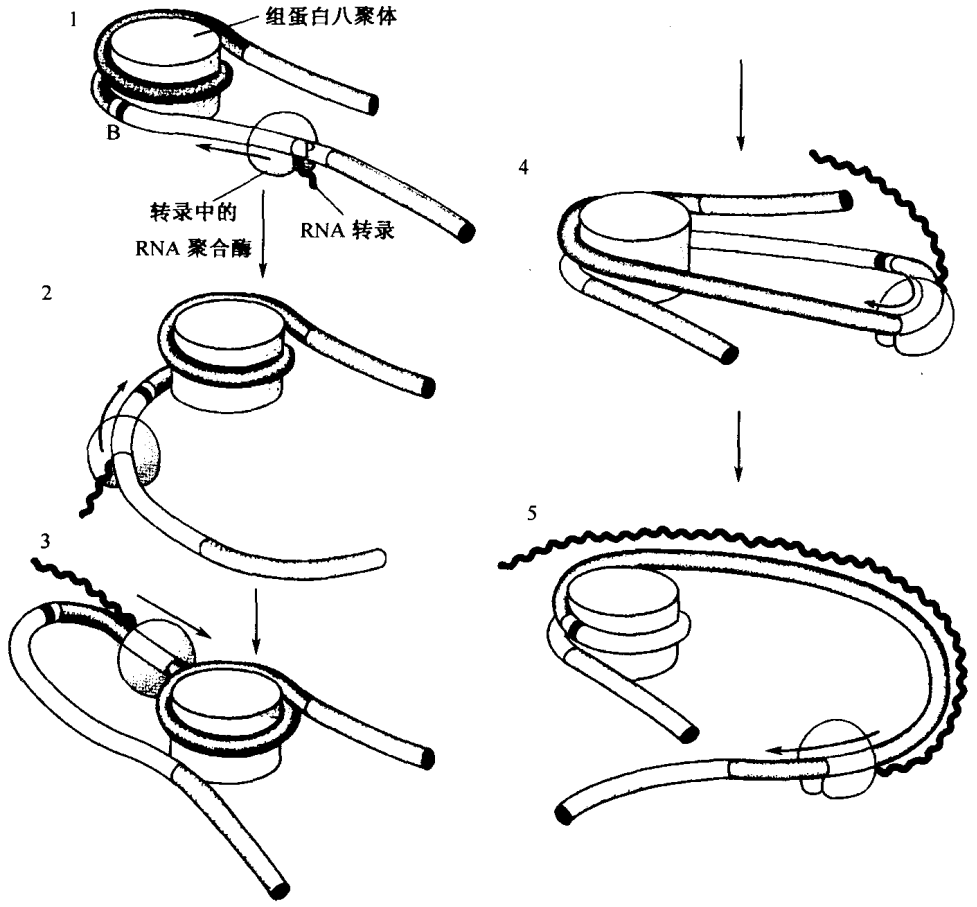


图11-31　通过核小体转录的卷轴模型（引自 Voet *et al.*，1995）

1.RNA聚合酶在启动子P位开始转录，B表示核小体的边界；2.当RNA聚合酶接近核小体时，诱导紧挨核小体的DNA与核小体脱离，露出组蛋白八聚体的表面；3.露出的组蛋白八聚体表面与RNA聚合酶后面的DNA结合，因而形成一个环；4.当RNA聚合酶继续前进时，转录过的DNA像卷轴一样围着组蛋白八聚体缠绕；5.RNA聚合酶后的DNA重新形成核小体，转录完成。

由于RNA聚合酶是巨型的分子，其体积大约是核小体的两倍，可同DNA上约50个碱基对结合，并且，在转录时DNA必须进行部分解链；因此，这种转录活性发生在与核小体表面紧密结合的DNA中看来是不可能的。于是有人提出了转录期间核小体部分解体的模型（图11-32）。

另一种核小体与转录关系的模型与乙酰化有关，即核心组蛋白的赖氨酸残基乙酰化。乙酰化的赖氨酸侧链不再带正电，不再与邻近的DNA作用。多年来已经采取提高组蛋白的乙酰化来提高转录水平，但是直到最近才鉴定出与组蛋白乙酰化相关的酶（如组蛋白乙酰转移酶）。这一作用与DNA上游结合蛋白的共激活机制相关。当受体与引起DNA反应的激素结合时，便能与共激活子CBP相互作用，使CBP将位于核心启动子区的核小体的组蛋白尾部乙酰化，这些乙酰化的组蛋白能够打开启动子进行转录机器的装配，导致基因的转录（图

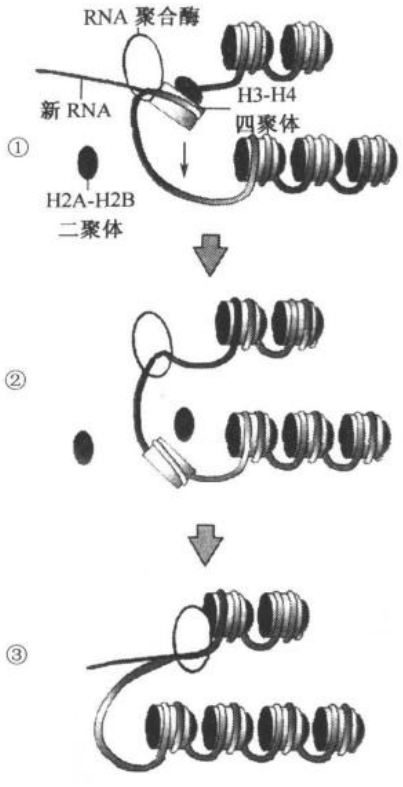


图 11-32　通过核小体核心颗粒转录模型（引自 Karp，1996）
①RNA 聚合酶使核小体变得不够稳定，形成丢失一半组蛋白（两个 H2A-H2B 二聚体）的复合物；②另外一半组蛋白核（H3-H4 四聚体）脱离 DNA，转移到聚合酶后面的 DNA 上；③H2A-H2B 二聚体与 DNA 结合形成完整的核小体。

11-33)。

11.4.5.5　核小体的位置与 DNA 的转录

核小体在 DNA 上的定位对于转录也有很大的影响。转录起始复合物的装配与启动子和增强子序列有关，如果核小体颗粒位于某些关键调控序列的一侧，如增强子序列存在于两个核小体之间，就有利于同转录因子结合（图 11-34a）。另外，由于核小体颗粒包装约占 150 个碱基对，这就有可能将 DNA 上两个原本是分开的调控序列拉近便于共同与转录因子作用（图 11-34b）。由此看来，在某些情况下，核小体的定位可促进 DNA 与调节蛋白的相互作用。

11.5　染　色　体

细胞分裂时，核内染色质凝缩而成的线状结构，对碱性染料染色很深，故名染色体（chromosome）。它是染色质经多级压缩包装而成，是染色质的高级结构，仅在细胞分裂时才出现。

11.5.1　染色体的包装

人的细胞平均含有 60 亿碱基对的 DNA，分布在 46 条染色体上，每个碱基对的长度是 0.34nm，60 亿碱基对的 DNA 加起来有 2m 长。另外，细胞内还结合有大量的水（每个碱基对结合 6 分子水），直径只有 10μm 的细胞核如何能够容下 2m 长的水溶性 DNA？染色质以核小体作为基本结构逐步进行包装压缩，经 30nm 染色质纤维、超螺线管、最后压缩包装成染色体，总共经过四级包装。

从 DNA 到核小体　核小体的装配是染色体装配的第一步，一个核小体的直径是 10nm，由 200 个碱基对的 DNA 组成，每个碱基对长度为 0.34nm，一个核小体伸展开来的长度是 70nm，由此推算，DNA 包装成核小体，大约压缩了 7 倍。

从核小体到螺线管（solenoid）　核小体通过自身形成螺旋的方式形成致密的、外径为 30nm 的管状结构，称为螺线管，又称 30nm 染色质纤维。从完整的细胞中常常可分离到 10nm 的核小体纤维和 30nm 纤维，只要改变提取液的盐浓度可将二者分开。至于核小体如何形成螺线管，曾提出几种假设，图 11-35 所示得到较多的认同。在染色质制取物中不会形成 30nm 的染色质纤维，因为在这种制取物中，组蛋白 H1 被去除了，提示 H1 介导了 30nm 染色质纤维的形成，如果加入 H1，又可形成螺线管。从核小体到螺线管压缩了 6 倍。

从螺线管到超螺线管（supersolenoid）　30nm 的染色质纤维进一步螺旋化，形成一系

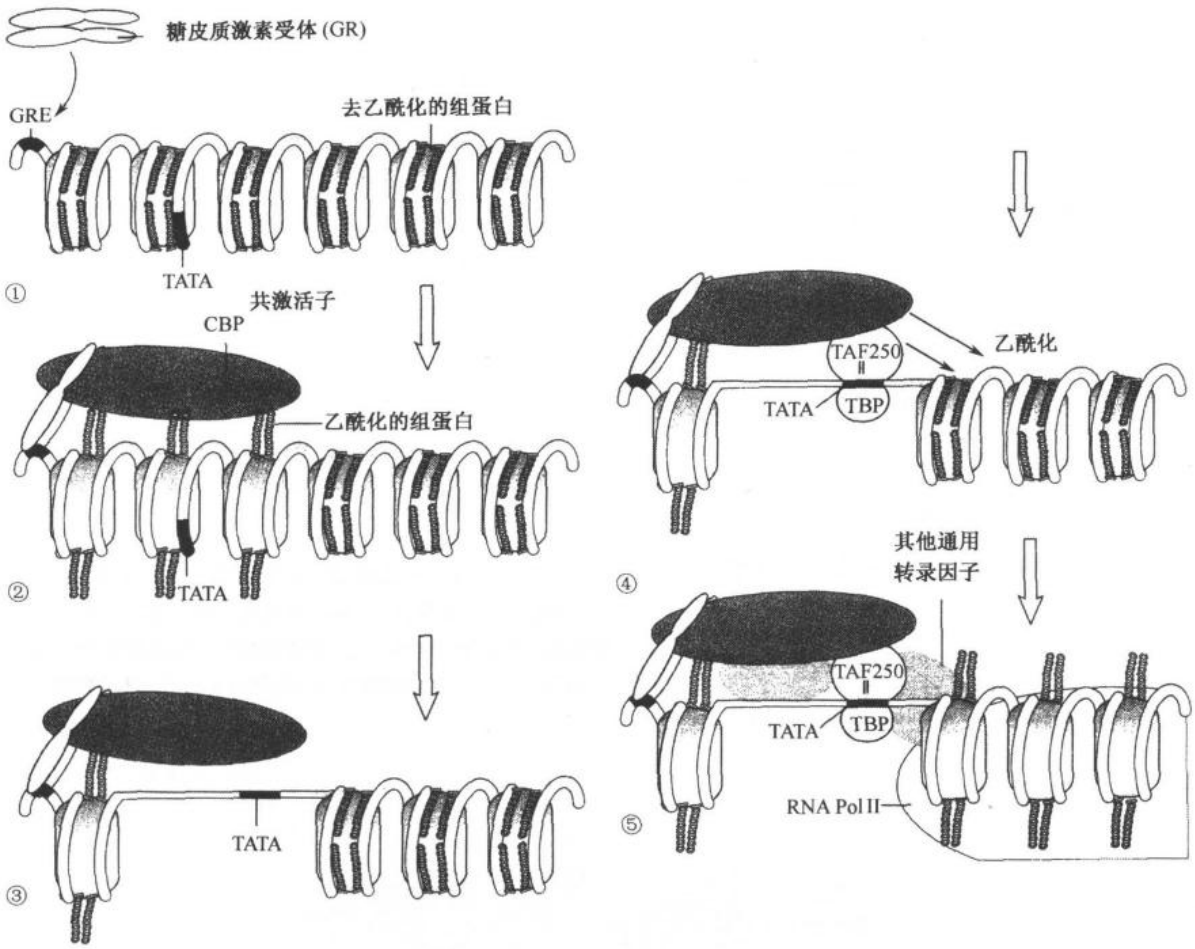


图 11-33　共激活子通过组蛋白乙酰化调节转录的作用模型（引自 Karp，1999）

转录因子，如糖皮质激素受体与 DNA 结合，引起共激活子（如 CBP）的结合，而 CBP 具有组蛋白乙酰基转移酶的活性（这些酶以乙酰 CoA 作为乙酰基供体转移到组蛋白的赖氨酸残基），引起组蛋白的乙酰化。图中所示是：① 被去乙酰化组蛋白核小体抑制的一段染色体；②GR 同 GRE 结合，然后 CBP 同 GR 结合，导致 TATA 框上游和下游核小体中的组蛋白乙酰化；③乙酰化的组蛋白与 DNA 脱离；④TFIID 与 DNA 的开放区结合，TFIID的一个亚基（TAFII250）也具有乙酰转移酶的活性。CBP 和 TAFII250 一起使更多的核小体组蛋白乙酰化，启动转录。⑤剩下的与启动子结合的核小体被乙酰化，RNA 聚合酶与启动子结合，转录开始。

列的螺旋域（coiled domain）或环（loop），这些环附着在支架（scaffold）蛋白上。螺旋域的直径是 300nm。然后，螺旋环进一步形成超螺旋环（supercoiled loop），或超螺旋域，此时的直径为 700nm（图 11-36），每个环估计含有 50～100kb DNA，推测染色质环仍然是基因协同表达的功能单位。典型的超螺旋环的开头和结束都是 A-T 富集序列并与核骨架或核基质蛋白结合在一起，其中包括 II 型拓扑异构酶，推测该酶调节 DNA 的超螺旋程度。DNA 从螺线管到超螺线管估计又压缩了 40 倍。

从超螺线管到染色体　超螺线管进一步螺旋化，形成直径为 1～2μm，长度为 2～10μm 的中期染色体，从超螺线管到染色体大约压缩了 5 倍。由此推算，DNA 经核小体到染色体，总共压缩了 8 400 倍。

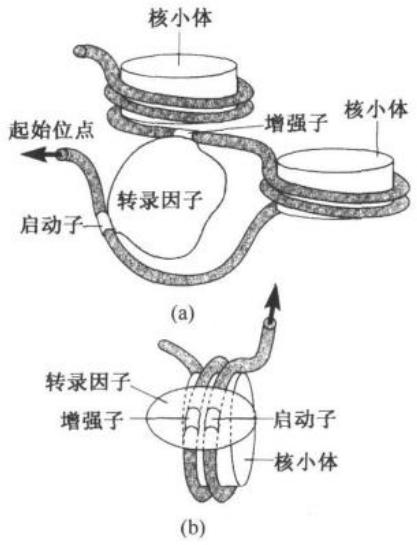


图 11-34　核小体的定位对转录的促进作用（引自 Karp，1994）

(a) 在这种情况下，核小体的定位，使基因调控的两个关键元件位于核心颗粒的外侧，能够同转录因子结合。在（b）中，调节元件被包装在核小体上，并且彼此靠在一起，能同时与转录因子结合。

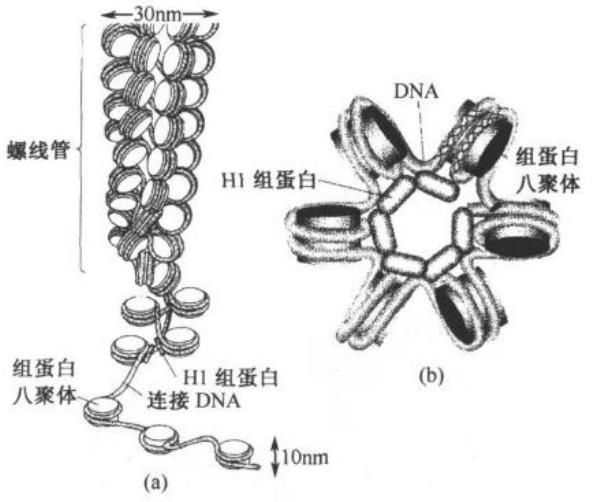


图 11-35　染色质 30nm 螺线管的两种视图

核小体螺旋装配成直径为 30nm 螺线管，每一螺旋由 6 个核小体组成，并呈规则排列。（a）侧面观察核小体包装成 30nm 螺线管；（b）从端部观察的每一螺旋中 6 个核小体的排列。

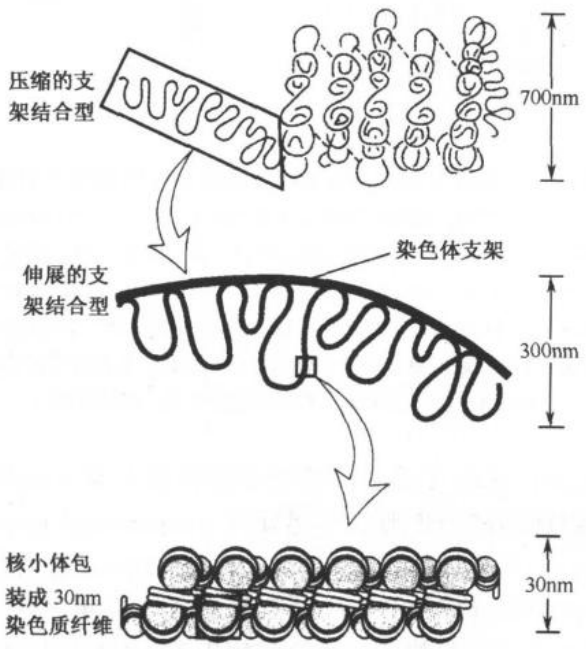


图 11-36　从螺线管到超螺线管的包装（引自 Lodish *et al*.，1999）

30nm 的染色质纤维沿染色体骨架蛋白形成直径为 300nm 的放射环，然后进一步压缩成直径为 700nm 的超螺线管。

DNA ——压缩 7 倍——→ 核小体 ——压缩 6 倍——→ 螺线管 ——压缩 40 倍——→ 超螺线管 ——压缩 5 倍——→ 染色单体

将 DNA 经由核小体包装成染色体的基本过程示于图 11-37。关于 DNA 包装的一些细节问题目前尚不清楚，如在 DNA 包装成染色体的过程中，组蛋白 H1 的分子中有 5 个不同的丝氨酸残基的磷酸化，这种磷酸化的作用有待进一步研究。

至于 DNA 包装成染色体的比例，一般为 10 000 倍左右，因有丝分裂期的 1μm 长度的染色体通常含有 1cm 长度的 DNA。据此推算，DNA 包装压缩比为 10 000∶1。这也是一种粗略的估计，不同的染色体在压缩时可能有所差异，如人的最长的 1 号染色体中的 DNA 包装成染色体时压缩了 8 800 倍（图 11-38）。

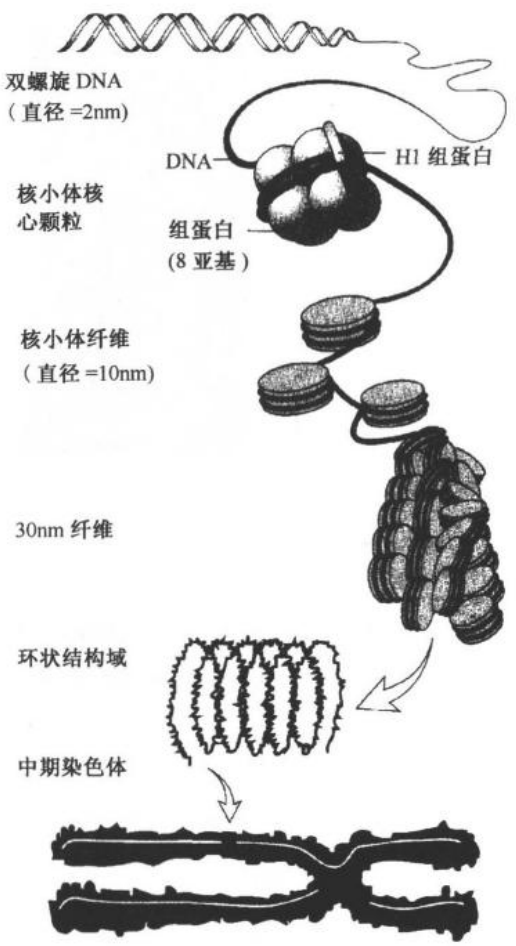


图 11-37　DNA 经四级包装形成染色体
（引自 Karp，1999）

11.5.2　中期染色体结构

在细胞周期的有丝分裂中期，染色体的形态结构比较稳定，所以，一般所描述的染色体的形态结构都是中期染色体（图 11-39）。

染色体有种属特异性，随生物种类、细胞类型及发育阶段的不同，染色体在数量、大小和形态上存在着差异。大多数生物的体细胞具有 12～50 条染色体，例如果蝇有 8 条染色体，而人的为 2 n = 46 条。染色体的长度为 0.2～50μm，一般为 1～10μm。

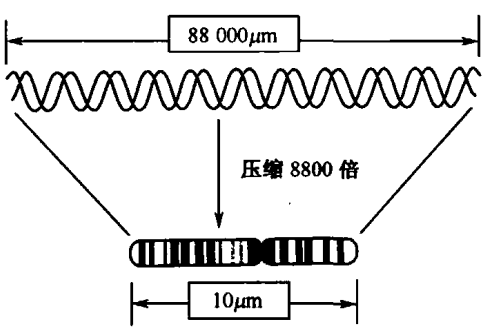


图 11-38　1 号染色体中的 DNA 包装倍数
（引自 Dudec，1999）
1 号染色体中的双螺旋 DNA 总长 88 000μm，包装成染色体后只有 10μm 长。

11.5.2.1　着丝粒和动粒

着丝粒（centromere）是染色体中连接两个染色单体、并将染色单体分为短臂（p）和长臂（q）。由于着丝粒处的染色质较细、内缢，又叫主缢痕（primary constriction）。此处 DNA 具高度重复，为碱性染料所深染。着丝粒有两个基本的功能：在有丝分裂前将两条姐妹染色单体

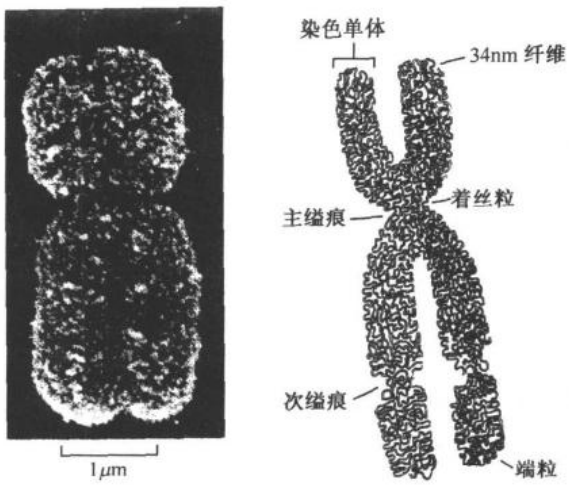


图 11-39　中期染色体的形态结构

结合在一起，第二个功能为动粒装配提供结合位点。着丝粒含有结构性异染色质，人的染色体着丝粒含有大约 170 碱基对的重复 DNA（称为 α 卫星 DNA），随机重复的次数达 2 000～30 000 次。

根据着丝粒在染色体上的位置，将染色体分为 4 种类型（图 11-40）。

中着丝粒染色体（metacentric chromosome）。着丝粒位于染色体的中部，两臂长度相等或大致相等。

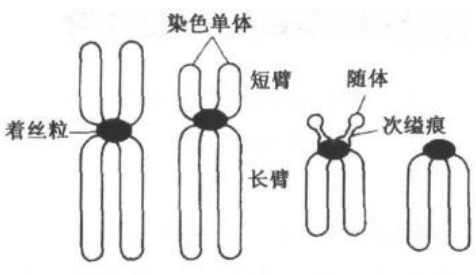


图 11-40　着丝粒在染色体中的不同位置

亚中着丝粒染色体（submetacentric chromosome）。着丝粒偏离中部，染色体的两个臂长短不一，短的叫做短臂，简写为 p，来自法文 petit 的字头；长的叫做长臂，简写为 q，为 p 的下一个字母。

近端着丝粒染色体（acrocentric chromosome）。着丝粒靠近染色体一端，长臂极长，短臂极短，甚至不易觉察。

端着丝粒染色体（telocentric chromosome）。着丝粒位于染色体末端，只有一个长臂。

动粒（kinetochore）是由着丝粒结合蛋白在有丝分裂期间特别装配起来的、附着于主缢痕外侧的圆盘状结构，内层与着丝粒结合，外层与动粒微管结合。每一个中期染色体含有两个动粒，位于着丝粒的两侧。

哺乳动物的动粒有两层结构，即内层和外层，直径约为 200nm。内层（inner layer），又叫内板（inner plate），是由动粒蛋白与 α 卫星 DNA 结合组装而成的，它结合在着丝粒上。外层（outer layer），又叫外扳（outer plate），是由一些特异的蛋白质在内板上装配而成的，其中含有与微管正端结合的蛋白质（图 11-41）。

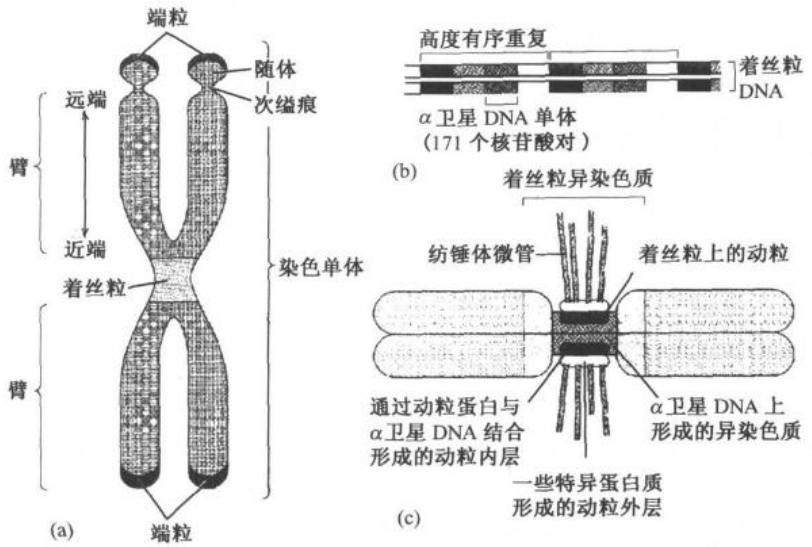


图 11-41　有丝分裂中的着丝粒与动粒（改自 Alberts *et al*. 2002）

（a）中期染色体模式图；（b）着丝粒区异染色质中 α 卫星 DNA 重复单位的组成；

（c）通过动粒蛋白质与着丝粒 α 卫星 DNA 结合而装配起来的动粒结构。

11.5.2.2　次缢痕与核仁组织区

次缢痕（secondary constriction）是染色体上的一个缢缩部位，由于此处部分的 DNA 松解，形成核仁组织区，故此变细。它的数量、位置和大小是某些染色体的重要形态特征。每种生物染色体组中至少有一条或一对染色体上有次缢痕。

核仁组织区（nucleolar organizing region，NOR）是细胞核特定染色体的次缢痕处，含有 rRNA 基因的一段染色体区域，与核仁的形成有关，故称为核仁组织区。核仁是 NOR 中的基因活动而形成的可见的球体结构。具有核仁组织区的染色体数目依不同细胞种类而异，人有 5 对染色体即 13、14、15、21、22 号染色体上有核仁组织区。

11.5.2.3　随体与端粒

随体（satellite）是位于染色体末端的、圆形或圆柱形的染色体片段，通过次缢痕与染色体主要部分相连。它是识别染色体的主要特征之一。根据随体在染色体上的位置，可分为两大类：随体处于末端的，称为端随体；处于两个次缢痕之间的称为中间随体。

端粒是染色体端部特征性的结构，前文已介绍。

11.5.3　核型与染色体分带

11.5.3.1　核型

核型（karyotype）又叫染色体组型，是指染色体组在有丝分裂中期的表型，是染色体数目、大小、形态特征的总和。在对染色体进行测量计算的基础上，进行分组、排队、配对，

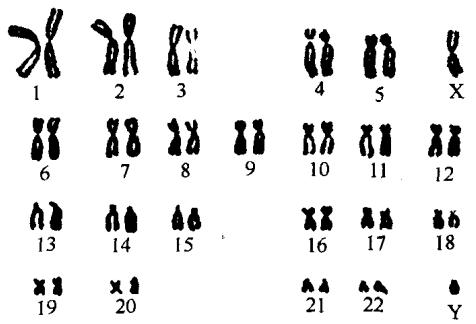


图 11-42　人的染色体核型

并进行形态分析的过程叫核型分析（图 11-42）。

11.5.3.2　染色体分带

用特殊的染色方法，使染色体产生明显的色带（暗带）和未染色的明带相间的带型（banding pattern），形成不同的染色体个性（图 11-43），以此作为鉴别单个染色体和染色体组的一种手段。染色体分带（chromosome banding）技术最重要的应用就是能够明确鉴别一个核型中的任何一条染色体，乃至某一个移位片段，同时也可用于核型进化及可能的进化机制研究。常用的分带技术有以下几种。

Q 带（Q-banding）又叫荧光分带法。用荧光染料喹吖因（quinacrine）染色，在紫外光激发下，显现明暗不同的带区，可在荧光显微镜下观察。一般富含 AT 碱基的 DNA 区段表现为亮带，富含 GC 碱基的区段表现为暗带。此法的优点是分类简便，可显示独特的带型。缺点是标本易褪色，不能做成永久性标本片。

G 带（Giemsa-banding）将染色体制片经盐溶液、胰酶或碱处理，再用 Giemsa 染料染色，在光镜下进行检查，见到特征性的带。一般富含 A-T 碱基的 DNA 区段表现为暗带。

C 带（C-banding）主要显示着丝粒区附近的结构性异染色质，也可显示其他区段的异染色质部分。标本可用酸（HCl）及碱（NaOH）变性处理，再经 2×SSC 在 60℃ 中温育 1h，最

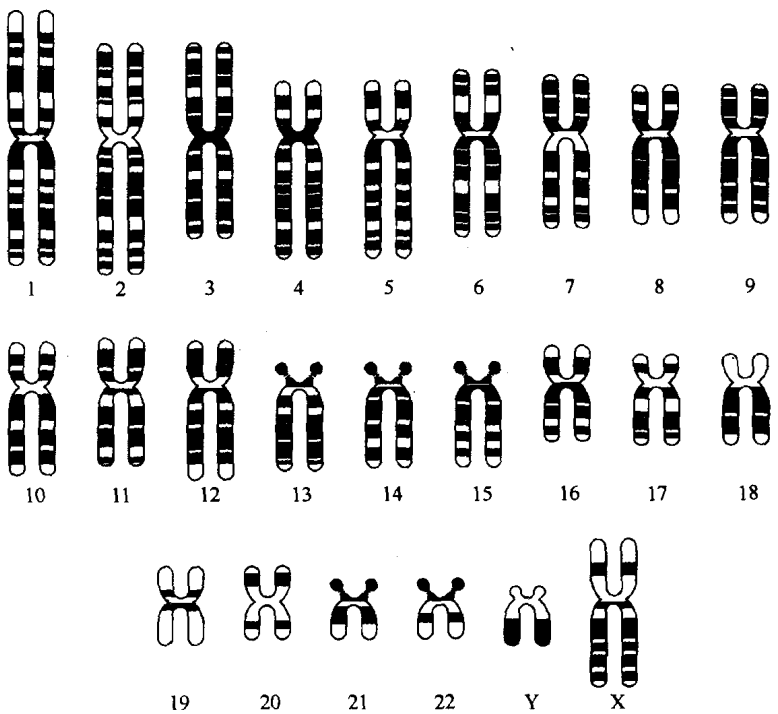


图 11-43　人的染色体带型

后用 Giemsa 染料染色显带。

N 带（N-banding）又称 Ag-As 染色法。主要用于染核仁组织区的酸性蛋白质。

R 带（reverse-banding）染色体用磷酸盐溶液进行高温处理，然后用吖啶橙或 Giemsa 染料进行染色，结果显示的带型同 G 带明暗相间的带型正好相反，故叫反带。

T 带（terminal-banding）是对染色体末端区的特殊显带法，能够产生特殊的末端带型。

11.5.4 巨型染色体

某些生物的细胞中，特别是在发育的某些阶段，可以观察到一些特殊的染色体，它们的特点是体积巨大，细胞核和整个细胞体积也大，所以称为巨型染色体（giant chromosome），包括多线染色体和灯刷染色体。

11.5.4.1 多线染色体

核内 DNA 多次复制产生的子染色体平行排列，并通过同源染色体配对，紧密结合在一起，从而阻止了染色体纤维进一步凝聚，形成体积很大的由多条染色体组成的结构叫多线染色体（polytene chromosome）。多线化的细胞处于永久间期，体积也相应增大，它存在于双翅目昆虫的幼虫组织内，如唾液腺、气管等。

多线染色体来源于核内有丝分裂（endomitosis）。对幼虫果蝇唾液腺细胞的染色体分析发现比其他类型的细胞中的染色体粗 100 倍。在幼虫发育期间，这些细胞停止了分裂，但体积不断增大，DNA 继续进行复制，以维持细胞的高分泌活性。复制的 DNA 链并不分开而是平行排列，产生的巨型染色体中所含 DNA 链是正常染色体的 1 024 倍（图 11-44）。

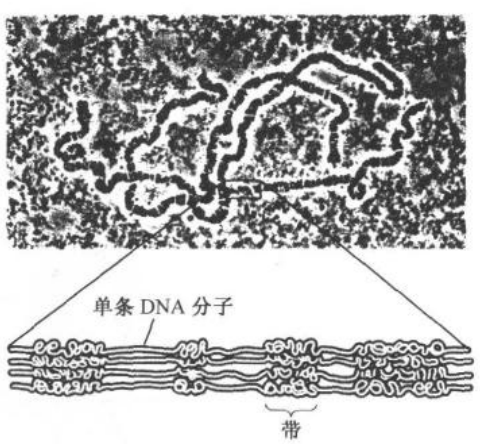


图 11-44 果蝇幼虫唾液腺多线染色体
（引自 Karp，1996）

在光镜下观察染色的多线染色体，可见一系列交替分布的带和间带（interband），有 5 000多条。同一种属中的不同个体间多线染色体的带型基本一致，但不同种果蝇的多线染色体的带型差别很大。后来发现带型与基因有关，不仅如此，多线染色体的带在遗传分析中有重要作用，如比较不同种多线染色体的带型可进行进化的研究。另外，多线染色体并非是细胞内的惰性结构，而是动态的，含有许多在发育的特定阶段形成胀泡（Puff）的区域，是 DNA 转录成 RNA 的结果（图 11-45）。

11.5.4.2 灯刷染色体

灯刷染色体（lampbrush chromosome）是卵母细胞进行第一次减数分裂时，停留在双线期的染色体。它是一个二价体，含 4 条染色单体，由轴和侧丝组成，形似灯刷（图 11-46）。染色体轴由染色粒（chromomere，是指染色质凝集而成的颗粒）轴丝构成，每条染色体轴长

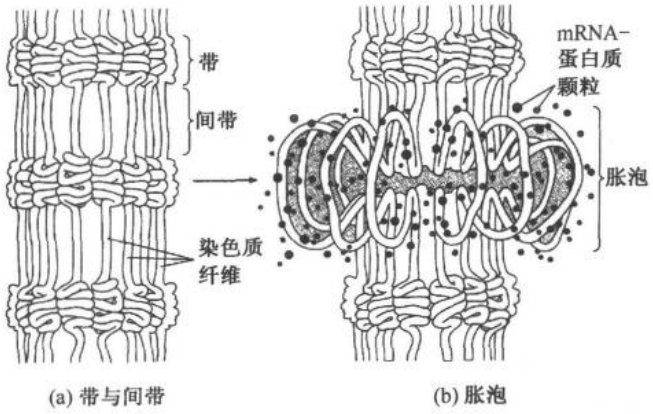


图 11-45　多线染色体的带与胀泡（引自 Wolfe，1993）

400μm，从染色粒向两侧伸出两个相类似的侧环，伸出的环是对称的，一个平均大小的环约含 100kb DNA。

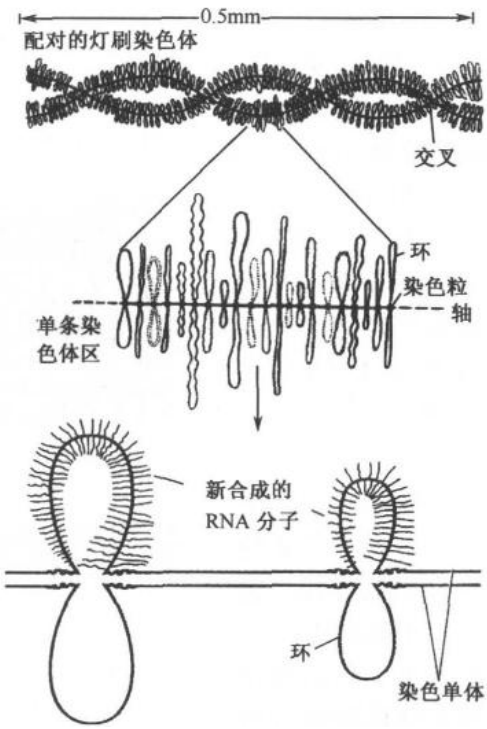


图 11-46　灯刷染色体的形态结构（引自 Kleinsmith *et al*.，1995）

灯刷染色体在染色粒轴丝上间隔形成侧环，环是成对的，但是由不同的染色质产生，环上还有 RNA 覆盖。

灯刷染色体的形态与卵子发生过程中营养物储备是密切相关的。大部分 DNA 以染色粒形式存在，没有转录活性，而侧环是 RNA 转录活跃的区域，一个侧环往往是一个大的转录单位，有的是由几个转录单位构成的。灯刷染色体侧环上的 RNA 主要是 mRNA，mRNA 与蛋白质结合形成无活性的 RNP 颗粒，这些颗粒储存在卵母细胞中，以便受精之后使用。与

DNA 结合并储存起来的蛋白主要是转录因子，如 FRGY2，在卵母细胞生长过程可选择性地调节基因表达。

灯刷染色体除了具有合成和储存的作用外，对于卵子发生期的核糖体合成有重要作用。在卵子发生的生长期，需要大量的核糖体；细胞核必须供给大量的核糖体 RNA 给细胞质体积已经很大的卵母细胞，势必给细胞核中核糖体基因的转录带来沉重的负担。为缓解这一问题，需要选择性地扩增 rRNA 基因，其结果，rRNA 基因的拷贝数成千倍的增加，这就相当于增加了核仁的数量。

11.6 核　　仁

大多数真核生物的细胞核的一个显著特点就是有 1 个大的球形结构的核仁（nucleolus）存在（图 11-47）。大多数细胞只含有 1 个或两个核仁，但也有少数细胞含有多个甚至上千个核仁。

核仁是细胞核中一个匀质的球体，由纤维区、颗粒区、核仁染色质、基质等四部分组成，主要功能是进行核糖体 RNA 的合成。

核仁是真核细胞间期核中最明显的结构。核仁的大小、形状和数目随生物的种类、细胞类型及细胞代谢状态而变化。蛋白质合成旺盛、代谢活跃的细胞，如分泌细胞、卵母细胞的核仁大，可占核体积的 25%。不具蛋白质合成能力的细胞如肌细胞、休眠的植物细胞，其核仁很小。

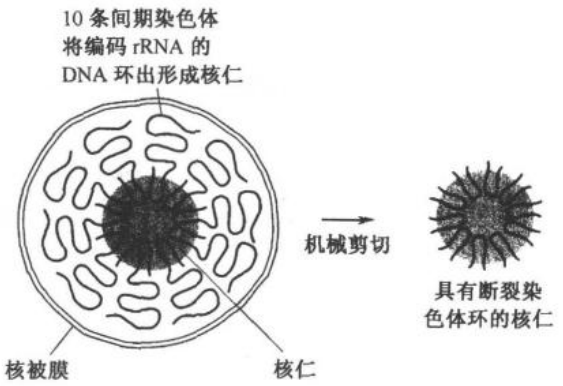


图 11-47　核仁的结构模式图(引自 Alberts *et al*., 1994)

11.6.1 核仁的结构与核仁周期

核仁呈圆或卵圆形，无界膜包被，是由多种组分形成的一种网状结构。

11.6.1.1 核仁的基本结构

在电镜的超微切片中可以看到，核仁包括 3 个不完全分隔的部分（图 11-48）。

纤维中心（fibrillar center，FC）呈浅染区，位于核仁的中央部位，直径 2～3 nm，能被 RNA 酶消化，由 DNA 和 RNA 组成。

致密纤维组分（dense fibrillar component，DFC）位于浅染区周围，直径为 5～10nm 的致密纤维，含有正在转录的 RNA 分子。

颗粒区（granular component，GC）呈致密的颗粒，直径为 15～20nm。位于周边，代表已合成的核糖体前体颗粒。

核仁除了上述 3 种基本结构外，还有一些其他结构。如在核仁的周围有一层染色质，被

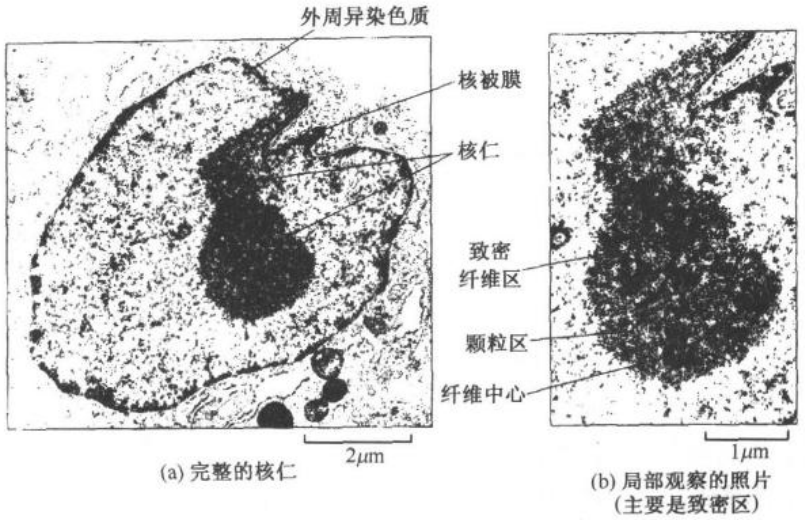


图 11-48　人成纤维细胞中核仁的电子显微镜照片（引自 Alberts *et al*., 1994）

称为核仁相随染色质（nucleolar associated chromatin）；有时，染色质还深入到核仁内部，称为核仁内染色质（intranucleolar chromatin）。此外，还有核仁基质（nucleolar matrix）或核仁骨架。

核仁的 3 种基本组分都是以某种方式与 rRNA 的转录与加工形成 RNP 的不同事件相关。

11.6.1.2　核仁周期

核仁是一种动态结构，随细胞周期的变化而变化，即形成-消失-形成，这种变化称为核仁周期（nucleolar cycle）。在细胞的有丝分裂期，核仁变小，并逐渐消失；在有丝分裂末期，rRNA 的合成重新开始，核仁形成。核仁形成的分子机制尚不清楚，但需要 rRNA 基因的激活。

11.6.2　核仁的功能

核仁是细胞合成核糖体的工厂，涉及 rRNA 的转录加工和核糖体大小亚基的装配（图 11-49）。

核仁的主要功能是进行 rRNA 的合成，并且是由专一的 RNA 聚合酶 I 负责转录。真核细胞中，rRNA 基因存在于特定的染色体上，并且有恒定的拷贝数。

每个 rRNA 基因转录单位由 RNA 聚合酶 I 转录，产生相同的初始转录物——前 rRNA。负责前 rRNA 加工的酶是 RNase，在人的 45S rRNA 前体上有 110 多个甲基化位点，这些甲基化的核苷酸序列全部进入加工后成熟的 rRNA 分子中。据此认为，这些甲基化位点可能是加工过程中酶的识别标记。

实际上，核仁中 rRNA 的合成、加工与核糖体的装配是同步进行的。核糖体亚基的装配是一个十分复杂的过程。研究表明，30 分钟内，首先是核糖体小亚基在核仁中成熟产生，很

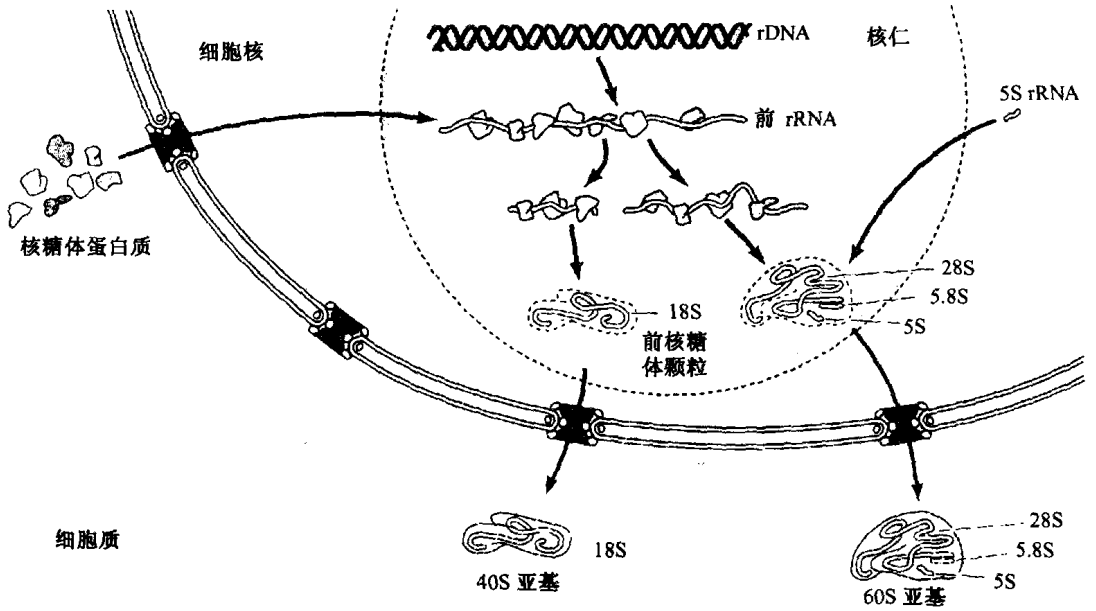


图 11-49　核仁在 rRNA 转录与核糖体装配中的作用（引自 Cooper, 2000）

快出现在细胞质中；而 28S、5.8S 和 5S rRNA 组装成大亚基需要 1 小时。

由于核糖体是合成蛋白质的机器，只要控制了核糖体的合成和装配就能有效地控制细胞内蛋白质的合成速度，调节细胞生命活动的节奏。因此，从某种意义上说，核仁实际上操纵着蛋白质的合成。

11.7　核基质

组成染色质纤维的 DNA 和蛋白质大约占细胞核总质量的 80%～90%，因此推测只要去除细胞核内的染色质纤维，细胞核就会解体。令人惊讶的是，1974 年 Berezney 和 Coffey 首次用核酸酶和去垢剂处理细胞核，除去了 95%的核物质后，剩下的竟是水不溶的纤维网络（图 11-50），将这种结构称为核基质（nuclear matrix），或称为核骨架（nucleoskeleton）。

从概念上讲，核基质是由蛋白质组成的细胞核内的骨架结构，分布在整个细胞核内，参与和支持 DNA 的各种功能，包括 DNA 复制、转录、加工、接收外部信号以及维持染色质的结构等，作用方式主要是提供作用位点。

11.7.1　核基质的化学组成

核基质主要是由中间纤维和其他一些目前还不太了解的蛋白质组成。前面讨论的 DNA 由 30nm 染色质纤维包装成超螺线管时，染色质要在蛋白质骨架上形成放射环结构，后来发现这种蛋白质骨架中有拓扑异构酶的存在，推测该酶也是核基质的组成成分。另外，核基质也包括核纤层，而且核纤层蛋白也是核骨架的主要成分。

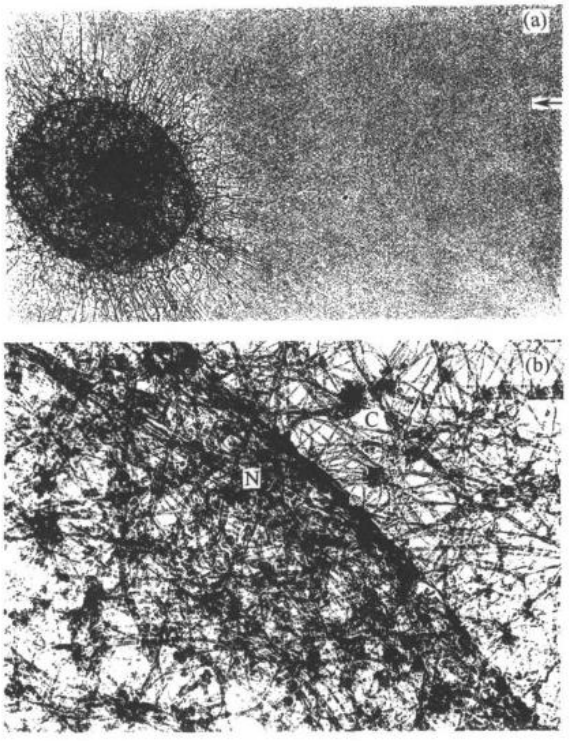


图 11-50　核基质（引自 Karp，1996）

(a) 在有去垢剂和 2 mol/L 盐存在下分离的细胞核电镜照片，只剩下由 DNA 环包围的核基质。箭头所指是 DNA 环的最外限。(b) 小鼠成纤维细胞的核基质，首先用去垢剂、高盐提取，然后用核酸酶和低盐处理除去染色质镶嵌 DNA。可见由残存的纤维状基质构成的细胞核（N）和细胞骨架基质构成的细胞质（C）区。

11.7.2　核基质的功能

从核基质的概念可知核基质的功能很多，主要是作为骨架，提供附着或支撑点。

11.7.2.1　染色体骨架

在染色体包装时需要非组蛋白作为染色体骨架（chromosome scaffold）。在间期，染色质以 30nm 纤维的形式存在于细胞核中，这需要在染色体骨架上将核小体 10nm 纤维进行压缩。为了证明染色体骨架的存在，可分离有丝分裂前的染色体，并用溶液溶解组蛋白和大多数主要的非组蛋白，然后在电子显微镜下观察，可见一完整的染色体构架（framework）或支架(scaffold)（图 11-51（a））。推测，染色体构架是细胞核中的核基质蛋白。当细胞进入有丝分裂前期时，非组蛋白的染色体骨架形成中心轴，染色质通过染色质结合蛋白在染色体骨架上进一步压缩包装，形成放射环（图 11-51（b））。

采用不同荧光标记的探针与人的间期细胞 DNA 进行原位杂交证实了染色质环的存在。实验中，探针的使用是一个关键，这些探针的作用位点最好是靠近推测的特定的 DNA 序列，

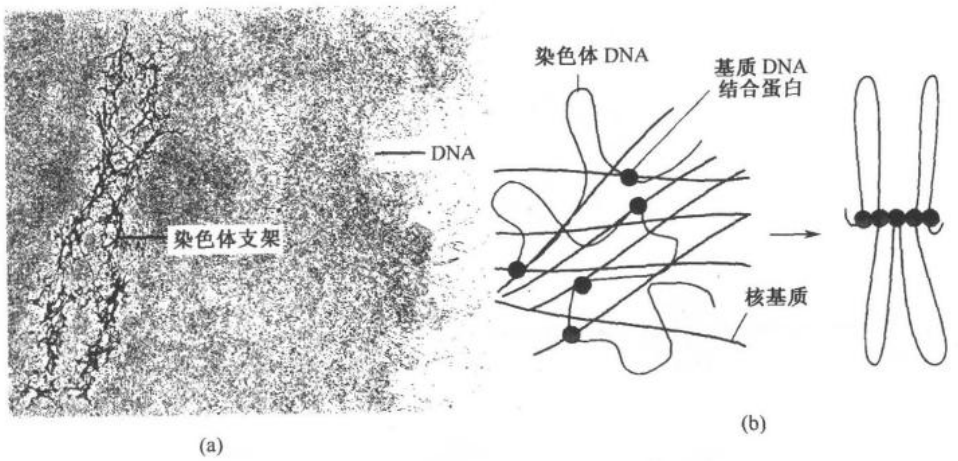


图 11-51　染色体支架及放射环（引自 Karp，1996）

(a) 用除去了大多数组蛋白和非组蛋白后剩下的染色体支架。(b) 染色质沿染色体骨架轴形成放射环。

即支架结合区（scaffold-associated region，SAR，又称基质结合区，matrix-associated region，MAR）。SAR 是位于转录的活性基因两端（或放射环两端）的 DNA 序列，富含 AT。SAR 中含有拓扑异构酶 II 的作用位点，通过 SAR 与拓扑异构酶结合，从而将染色质锚定于核骨架上，并形成染色质环（图 11-52）。

原位杂交分析染色质放射环的原理是：由于各探针在活性 DNA 上作用位点间的距离都在几百万碱基对，如果这些位点都在同一个放射环上，那么杂交后显示的距离就很近。

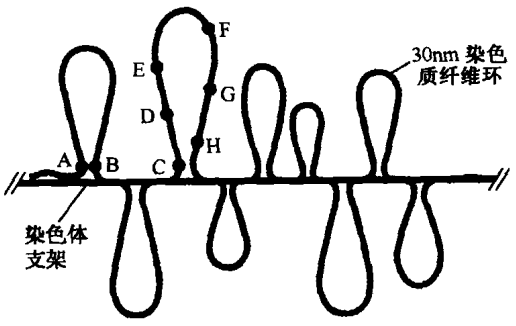


图 11-52　间期染色质环的实验证明（引自 Lodish *et al*.，1999）

图中的 A、B、C……表示不同的探针，其中 A 和 B 的杂交位点在同一个环，其他的在另一相同环内。

11.7.2.2　核纤层蛋白的骨架作用

核纤层位于内核膜的下方，是一种纤维网络，为细胞核提供结构支持。核纤层是由核纤层蛋白单体组装起来的多聚体的纤维（图11-53）。组装的第一步是由两个核纤层蛋白多肽链通过各自的 α 螺旋区相互缠绕形成螺旋化的螺旋（coiled coil）；第二步是二聚体通过头尾连接形成长的多聚体；第三步是多聚体之间通过侧向连接形成核纤层。核纤层蛋白可以通过两种方式与内核膜相连，一种方式是在核纤层蛋白翻译后在 C 末端的一个半胱氨基残基添加脂，然后通过脂锚定的方式将核纤层蛋白结合到内核膜。第二种方式是核纤层蛋白与内核膜的膜蛋白结合，结合的内核膜蛋白将核纤层蛋白组织成为网络结构，并介导与内核膜结合。

核纤层蛋白装配成核纤层纤维网络后附着在内核膜上，成为膜骨架，极大地增强了核膜的机械强度，实际上为细胞核的形态与功能提供了结构支持（structural support），同时对于核重建也具有重要作用。另外，细胞核内的染色质通常要组成大的染色体环，核纤层为染色质提供锚定位点，从而介导了染色体环的形成（图 11-54）。

核纤层蛋白位于内核膜的下方，它不仅是核膜下的骨架，对于维持细胞核的形态和核重建具有重要作用，同时也为染色质提供锚定位点（图 11-53）。

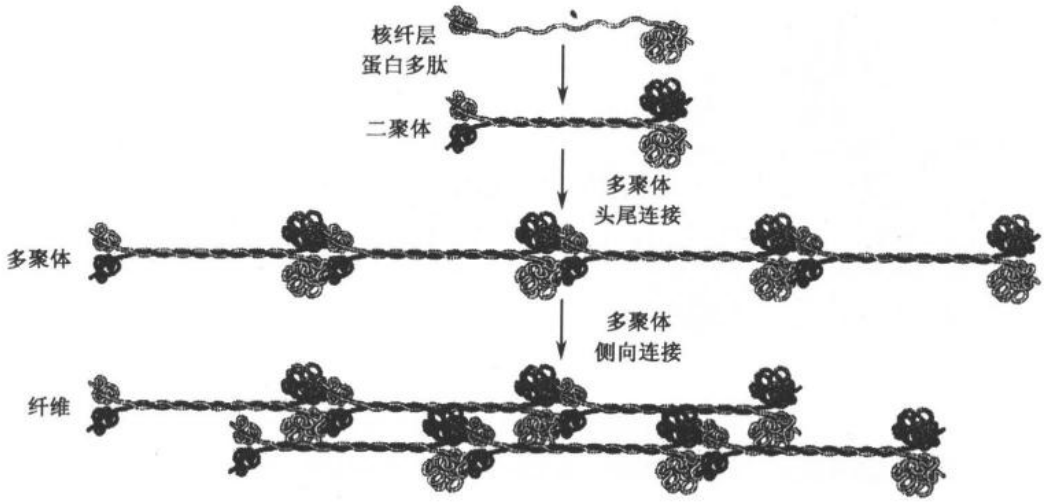


图 11-53　核纤层的装配模型（引自 Cooper，2000）

11.7.2.3　DNA 复制时的染色质附着位点

由于核纤层为染色质提供了锚定位点，所以，在一段时期内，一直认为真核生物的 DNA 复制也同细菌 DNA 复制一样，与核被膜结合在一起。但是通过 ^{3}H 标记的实验表明，新合成的放射性 DNA 并不与核被膜相连。通过核分布研究表明，新合成的 DNA 是与核基质结合在一起的。这一结果提示，DNA 是通过固定在核骨架上的位点进行复制的（图 11-55），后来的荧光显微镜实验也证明了这一点。

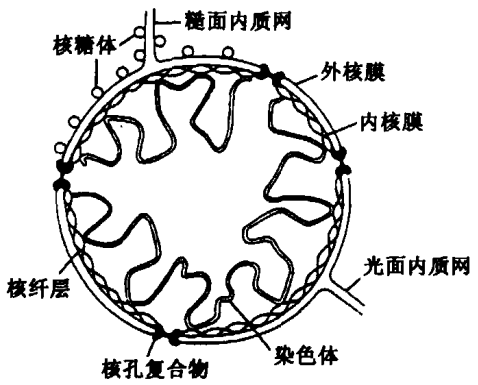


图 11-54　核纤层蛋白及核纤层蛋白网络

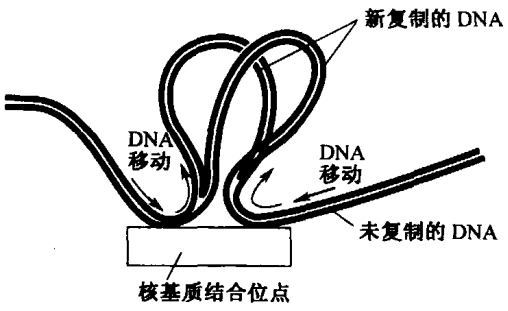


图 11-55　真核生物 DNA 通过在核骨架上的固定位点进行双向复制模型（引自 Kleinsmith et al.，1995）

提　要

细胞核是细胞的遗传机构，主要有两个功能：一是通过遗传物质的复制和细胞分裂保持细胞世代间的连续性；二是通过基因的选择性表达，控制细胞的活动。

真核生物的细胞核有双层的核被膜包裹着，核被膜由外核膜、内核膜、核周腔、核孔复合体和核纤层等5个部分组成。核孔复合体具有选择性运输作用，核蛋白进入细胞核须由核定位信号（NLS）引导，并且要有一种小GTP结合蛋白的帮助。

分子伴侣是细胞内的一类蛋白质，它们介导其他蛋白质的正确装配，但自己不成为最后功能结构中的组分。第一个被发现的分子伴侣是核质蛋白，它介导核小体的组装。分子伴侣的功能有：帮助蛋白质折叠和装配、帮助蛋白质的运转和定位、参与细胞器和细胞核结构的发生、参与应激反应、参与信号转导等。

染色质是细胞间期细胞核内能被碱性染料染色的物质，由DNA和蛋白质组成。染色体是由染色质压缩包装而成的棒状结构，是中期染色质的表现形式。组蛋白是真核生物染色体的基本结构组分，有H1、H2A、H2B、H3、H4等五种类型。它们带正电荷，能与DNA中带负电荷的磷酸基团相互作用。其中H2A、H2B、H3、H4为核小体核心组蛋白；H1在构建核小体时起连接作用。组蛋白的某些氨基酸侧链常会被磷酸化、乙酰化或甲基化以及ADP的核糖化等修饰，这些修饰对保护、稳定和调控遗传物质的功能起重要作用。

非组蛋白是指细胞核中不参与核小体组成的一类蛋白质，它们有多种功能：包括参与染色体的构建、调控基因的表达等。

根据染色质染色反应不同，分为异染色质与常染色质，异染色质通常没有转录活性。

核小体又称核体、核粒。由146个碱基对的DNA在八聚体的组蛋白外绕了$1\frac{3}{4}$圈，H1位于核小体DNA的进出口处。两相邻核小体之间以连接DNA相连。在DNA复制和转录时，核小体不会完传解体。有多种模型推测核小体与转录的关系。

DNA经过4步包装形成染色体，从DNA到染色体共压缩了8 400倍。

着丝粒又称主缢痕，动粒是装配在着丝粒外侧的2层蛋白质结构，细胞分裂时提供了与纺锤体微管结合的位点。而次缢痕则是核仁组织区。

某些生物在发育过程中，某些组织的细胞会出现巨型染色体，包括多线染色体和灯刷染色体。

核仁由纤维区、颗粒区、核仁染色质、基质等四部分组成。它是一种动态结构。核仁的主要功能是合成RNA、装配核糖体，也在一定程度上控制着蛋白质合成的速度。

12　细胞周期与细胞分裂

生长和增殖是生物的基本特性，无论是单细胞的生物还是多细胞的生物，每个细胞都必须进行生长和分裂。细胞通过分裂形成的新细胞必须具有与亲代细胞相似的遗传性，因此，细胞分裂的前提是遗传物质的复制、各种细胞器及生物大分子的倍增与细胞体积的增大。细胞通过分裂，将复制的遗传物质均等地分配到两个子细胞中，保证了细胞遗传的稳定。

12.1　细胞周期

人们习惯于用“周期”一词来思考生物学过程，包括生命周期、代谢周期、生理周期。生命是从一代向下一代传递的连续过程，因此是一个不断更新、不断从头开始的过程。任何细胞都是一个生命，从某种意义上说就如同一个生物体。细胞的生命开始于产生它的母细胞的分裂，结束于它的子细胞的形成，或是细胞的自身死亡。通常将通过细胞分裂产生的新细胞的生长开始到下一次细胞分裂形成子细胞结束为止所经历的过程称为细胞周期（cell cycle）（图 12-1）。在这一过程中，细胞的遗传物质复制并均等地分配给两个子细胞。

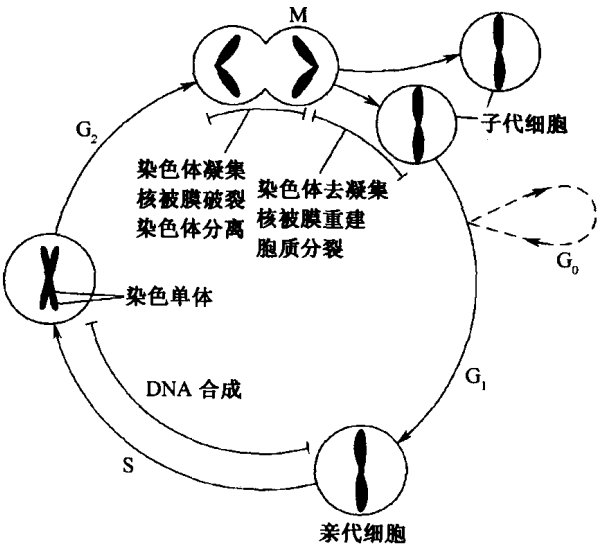


图 12-1　细胞周期及染色体行为（引自 Lodish *et al*., 1999）

12.1.1　细胞周期时相及类型

细胞周期是一个相当复杂的过程，不同类型的细胞周期持续的时间不完全相同，而且，细胞的分裂状态也各有异。

12.1.1.1 细胞周期的时相

根据光学显微镜所观察到的细胞分裂时的活动，将细胞周期分为两个主要的时期：分裂期（mitotic phase）和间期（interphase），分裂期简称为M期（M phase）。

M期包括细胞的核分裂和胞质分裂两个过程。在有丝分裂的过程中，复制的染色体被分到两个细胞核中，胞质分裂则是将整个细胞一分为二，形成两个子细胞。M期所持续的时间较短，一般为30～60min；分裂间期的时间跨度较长，根据细胞的类型和所处的条件不同而不同，有几小时、几天、几周或更长。

分裂间期实际上是新细胞的生长期，根据新细胞从开始生长起到分裂前止的分裂间隔期中的生理和生化变化，可分为G_1期（gap_1 phase）、S期（synthetic phase）、G_2期（gap_2 phase）。

细胞周期所持续的时间一般为12～32h，人的细胞周期约为24h：分裂期30min，G_1期9h，S期10h，G_2期4.5h。

不同生物的细胞周期时间是不同的，同一系统中不同细胞的细胞周期的时间也有很大的差异。一般说来，$S+G_2+M$的时间变化较小，而G_1期持续时间的差异可能很大。如小鼠食管和十二指肠上皮细胞同属于消化系统，但它们的细胞周期时间却明显不同，分别为115h和15h。这种差异主要是由G_1期的不同造成的，因为食管上皮细胞的G_1期长达103h，而十二指肠上皮细胞的G_1期仅为6h。由此看来，细胞周期的长短主要决定于G_1期的长短（表12-1）。

表12-1 几类不同细胞周期的比较

细胞类型	细胞周期各时相/h				
	G_1	S	G_2	M	合计
人宫颈瘤细胞（HeLa）	8	6	4.5	1.5	20
人骨髓瘤细胞（正常）	25～30	12～15	3～4	—	40～50
人骨髓单核细胞性白血病					
指数期细胞	5	12.1	2.1	0.5	19.7
半稳定期细胞	30.2	16.2	3.8	0.6	50.8
停滞期细胞	47.7	31.0	7.3	0.7	86.7
急性淋巴性白血病白细胞	1～10天以上	20	2～3	1.0	2～10天以上
中国仓鼠成纤维细胞	2.7	5.8	2.1	0.4	11
小鼠肿瘤细胞	—	12	6	0.5	18.5
小鼠成纤维细胞	9.1	9.9	2.3	0.7	22.0

12.1.1.2 细胞周期和细胞类群

在正常的情况下，一个完整的细胞周期应包括4个时期，细胞沿着$G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2 \rightarrow M$期的路线运转，通过M期，母细胞一分为二产生两个子细胞。但在细胞社会中，不仅细胞彼此分工不同，分裂行为也有所差异。根据细胞的分裂行为，可将真核生物细胞分为3类。

持续分裂细胞 又称周期性细胞，即在细胞周期中连续运转的细胞。机体内某些组织需要不断地更新，组成这些组织的细胞就必须通过不断分裂产生新细胞。此类细胞的分裂周

期非常正常，有丝分裂的活性很高。如性细胞（包括卵母细胞和精原细胞），它们要不断地产生配子；造血干细胞需要不断地产生红细胞和白细胞；上皮基底层细胞需要通过分裂不断补充表面老化死亡的细胞；植物的根茎尖端细胞需要通过分裂进行生长等都是具有正常周期的持续分裂细胞。

终端分化细胞　即永久性失去了分裂能力的细胞，它们不可逆地脱离了细胞周期，但保持了生理活性机能。这些细胞都是高度特化的细胞，如哺乳动物的红细胞、神经细胞、多形性白细胞、肌细胞等，这些细胞一旦分化，就永远保持这种不分裂状态直到死亡。

G_0 细胞　又称休眠细胞，暂时脱离细胞周期，不进行 DNA 复制和分裂，也称静止细胞群。但这类细胞可在某些条件的诱导下重新开始 DNA 合成，进行细胞分裂。如肝细胞，外科手术切除部分肝组成后可以诱导肝细胞进行细胞分裂。淋巴细胞可通过与抗原的相互作用诱导增殖。

在胚胎发育早期（卵裂期），所有的细胞均为周期性细胞，以后随着发育成熟，某些细胞进入了 G_0 期，某些细胞分化后丧失分裂能力。到成体时，只有少数细胞处于增殖状态，它们的增殖仅作为补充丢失的细胞，或对外界刺激的反应。

12.1.2　细胞周期各时相的合成活动

在细胞周期的不同阶段中，生化合成反应是不同的。

12.1.2.1　G_1 期

G_1期是从有丝分裂完成到 DNA 复制前的一段时期，又叫合成前期。此期主要合成 rRNA、蛋白质、脂类和糖类。在 G_1 期的后期，DNA 合成酶的活性大大增加。

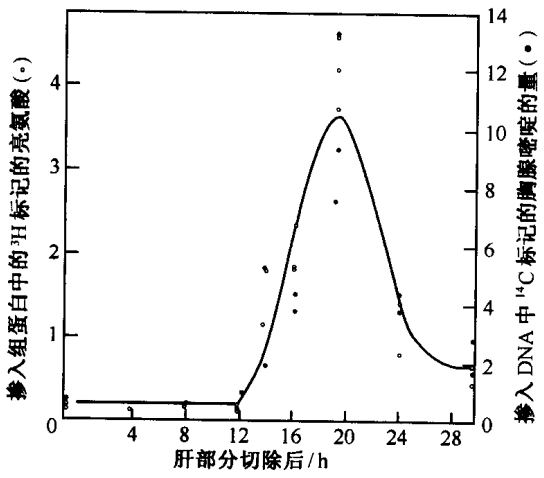


图 12-2　DNA 和组蛋白合成的协同性实验
（引自 Karp，1999）
将大鼠的肝组织部分切除，诱导肝组织的细胞同步化生长。手术后的不同时间注射^{3}H 标记的亮氨酸和^{14}C 标记的胸腺嘧啶，1 小时后测定 DNA 的放射性（实心圆）和组蛋白（空心圆），结果显示它们的合成是同步的。

G_1 期进入 S 期与 S 期激活因子有关。如将 S 期和早 G_1 期细胞融合，S 期细胞可以诱导 G_1 期细胞提前进入 S 期，表明早 G_1 期细胞尚未出现 S 期激活因子。

12.1.2.2　S 期

S 期即 DNA 合成期（DNA synthesis phase）。细胞周期中 S 期是最重要的一个时期，在此期，除了 DNA 合成外，同时还会合成组蛋白，DNA 复制所需的酶都在这一时期合成。

组蛋白的合成主要是在 S 期。在 S 期，组蛋白的 mRNA 水平可增加 50 倍。也就是说，DNA 的合成和组蛋白的合成在时间上是同步的（图 12-2），在密度上是相应的，从而使新

合成的 DNA 得以及时包装成核小体。另外，推测组蛋白起 DNA 复制延长因子的作用，没有组蛋白，DNA 的复制就会停止。

此外，还发现 DNA 复制时，不同的序列复制先后不同，具有时间顺序，即常染色质复制在先，异染色质在后；能转录的 DNA 复制在先，不能转录的 DNA 在后；GC 含量高的 DNA 复制在先，AT 含量高的在后。

12.1.2.3 G_2 期

G_2期是 DNA 合成的后期。在这一时期，主要是大量合成 ATP、RNA、蛋白质，包括微管蛋白和促成熟因子（maturation promoting factor，MPF）等，为有丝分裂做准备。

12.1.2.4 分裂期

分裂期是从细胞染色体的凝聚、分离并平均分配到两个子细胞过程。分裂后，S 期合成的 DNA 减半。这一期的特点是 RNA 合成停止，蛋白质合成减少，染色体高度螺旋化。

12.1.3 细胞周期中细胞形态结构的变化

细胞周期各阶段的生化变化必然会引起细胞的表型变化，包括外部表型和内部表型。

12.1.3.1 细胞形态的变化

有些处于 S 期的细胞呈扁平状，紧贴在培养瓶壁上，细胞表面的微绒毛和小泡很少。细胞进入 G_2 期，特别是 G_2 期的中后期，细胞渐渐从贴壁扁平的状态鼓起来，而细胞表面的微绒毛增多，此时摇动培养瓶，细胞很容易与瓶壁脱离。进入 M 期的细胞，变成球形。

12.1.3.2 细胞内部结构的变化

细胞周期过程中内部结构的最大变化是染色质结构的变化。在 S 期，染色体处于极松散的状态，DNA 半保留复制和核小体八聚体组蛋白全保留方式偶联。到 G_2 期已形成两条染色质纤维；到 M 期，染色单体形成。

与染色体复制周期相关联的是核仁的变化。从细胞分裂前期到 M 期中期，核仁消失，核膜解体；分裂后期重新形成核膜。

在间期向分裂期过渡中，有两点明显的变化：一是形成纺锤体，需要大量的微管蛋白，另一是细胞表面微绒毛的形成，这与细胞骨架的肌动蛋白纤维相关。

12.1.3.3 细胞器的分裂和片段化

有丝分裂不仅要保证新形成的子细胞得到全套的遗传物质，同时要保证子细胞得到其他必需的细胞结构，包括膜结合细胞器。由于线粒体和叶绿体等不能自我装配，只能靠已有的线粒体和叶绿体的生长和分裂增殖，所以，线粒体和叶绿体与细胞分裂同步，使数量加倍。其他的膜结合细胞器，如内质网、高尔基体等要生长并断成片段，这样才能增加均等分配的机会。

12.1.4 细胞周期的研究方法

通过细胞的体外培养和分析，发现处于细胞周期不同阶段的细胞，其形态学和生化特点有所不同，对辐射、药物、病毒的感染、酶诱导的敏感性也均有差异。由于 M 期较短，在一个培养的群体中，无论何时检查，只看到极少数细胞处于分裂状态。为了研究细胞周期的不同阶段的生化特性，必须获得细胞周期一致性的细胞，这就是细胞的同步化（synchronization）。

细胞同步化分为自然同步化和人工同步化。

自然同步化是自然界存在的现象，在动、植物细胞都有发现。它们不受人为条件的干扰，因而有可能在接近自然的条件下进行观察，但自然同步化的细胞群体受到诸多条件的限制，对结果有很大的影响。人工同步化是利用细胞培养的方法，用各种理化因素处理获得的同步化生长的细胞。常用的细胞人工同步化的方法分为选择同步化、诱导同步化或者两者的结合。

除了利用同步化细胞研究细胞周期外，条件突变在细胞周期的研究中也有重要作用。

12.1.4.1 诱导同步法

诱导同步法（induction synchrony）是通过控制培养条件，将非同步培养中的所有或大部分细胞暂时性地阻止在细胞周期的某个阶段，最终使所有细胞达到同步化生长。常用的手段有改变温度、添加代谢抑制剂将细胞阻止在细胞周期的某一阶段。

胸腺嘧啶阻断技术　高浓度的胸腺嘧啶能够阻断 DNA 合成所需的核苷酸的合成，因此将细胞群体培养在具有高浓度的胸腺嘧啶的培养液中时，非同步化的细胞能够正常地通过 G_1 期，但到达 S 期时，因 DNA 的合成被阻断，这些细胞不能顺利通过 S 期进入 G_2 期。经过对 S 期的短暂阻断，再改变胸腺嘧啶的浓度，解除抑制，所有的细胞都开始 DNA 的合成，即获得处于同步生长的细胞。

中期阻断法　某些药物可抑制微管的聚合，因而抑制有丝分裂器的形成，将细胞阻断在有丝分裂的中期。同 DNA 合成阻断法相比，中期阻断法的非同步生长的问题并不十分明显，但此种阻断法的可逆性较差，阻断时间较长，获得的细胞中的一些细胞将不能完成正常的有丝分裂而出现异常分裂，常用的阻断药物是秋水仙素。

12.1.4.2 选择同步法

虽然诱导阻断法是广泛使用的获得同步化细胞群体的方法，但这种方法的主要缺陷是对细胞有副作用，因为使用的是毒性物质。选择同步化（selection synchrony）的方法可克服同步化过程中对细胞的毒性影响，因为选择同步化是用物理方法将处于细胞周期中同一阶段的细胞从非同步的群体中分离出来。

有丝分裂选择法　是根据细胞在细胞周期的不同阶段的生理变化设计的一种方法。单层培养于细胞培养瓶内的非同步化的细胞群体中，处于对数期增殖的细胞分裂活跃，分裂指数高，分裂细胞变圆、隆起，与培养器的黏着性降低。此时轻轻摇动，M 期的细胞就脱离器皿壁

而悬浮于培养液中，其他阶段的细胞则不会脱落。将倾出培养液储存于4℃保存，再向培养瓶中加入37℃新鲜培养液继续培养，经1～2h，再如同上法收集M期的细胞。每1～2h摇动并收集细胞，最后集中所收集的培养液，离心后，可获得一定数量的M期的同步化细胞。此法的优点是不受药物的影响，同步化程度高，不足之处是分离的细胞少，手续繁琐。

细胞沉降分离法　该法是另一种选择同步化的方法，主要用于悬浮培养的细胞。由于细胞在其周期过程中，体积逐渐增大，所以处于细胞周期不同阶段的细胞体积不同。而细胞在某一离心力场中的沉降速度与其半径平方成正比，因此可用沉降法分离所处周期时相不同而大小不同的细胞。此法也可用于贴壁生长的细胞，但因同一时相的细胞大小并非都是一致的，故用此法获得的细胞的同步化程度有限。

12.1.4.3　条件突变体的利用

利用条件突变体（conditional mutant）可研究细胞周期中的重要事件。例如温度敏感突变使细胞对于某种温度敏感，这样可用正常温度培养细胞而用突变温度来研究突变的事件。这种方法研究酵母细胞特别有用。在酵母中鉴定了几十种细胞分裂周期（cell-division cycle, cdc)）突变体，这些突变体被分别阻止在细胞周期的不同阶段。后来发现 *cdc* 基因对于正常的细胞分裂周期的调控具有重要作用。

12.2　细胞周期调控

细胞周期的研究不仅是基础细胞生物学的重要研究课题，而且对于癌症的研究也有十分重要的意义，癌实际上是破坏了细胞分裂调控能力的一种疾病。

美国科学家Hartwell、英国科学家Hunt和Nurse因发现了细胞周期关键分子的调节作用获得了2001年医学/生理学诺贝尔奖。Hartwell的主要贡献是发现了控制细胞周期的“*START*”基因、Hunt的主要贡献是发现了细胞周期的关键调节物质CDK（细胞周期蛋白依赖性激酶）、Nurse的主要贡献是发现了调节CDK功能的Cyclin（细胞周期蛋白）。

12.2.1　细胞周期调控概述

从调控的观点来看，细胞周期的调控操作就像是一部全自动的洗衣机。洗衣机的基本操作是加水、洗涤、漂洗和甩干。洗衣机的这些基本循环同细胞周期中的DNA复制、有丝分裂等的基本循环是相似的。在这两种情况下，都是通过中央控制系统（central control system）控制的。在原理上，洗衣机与细胞周期的控制操作都像是一部定时器，但实际上，无论是洗衣机还是细胞周期，它们都是根据在不同过程中的信息反馈来进行自我调节。在每一个过程中，都是通过检测器的作用，向控制中心发回信号（图12-3)。

关于细胞周期调控的方式，早期有两种观点，一种是连锁反应，另一种是协同反应（图12-4)。

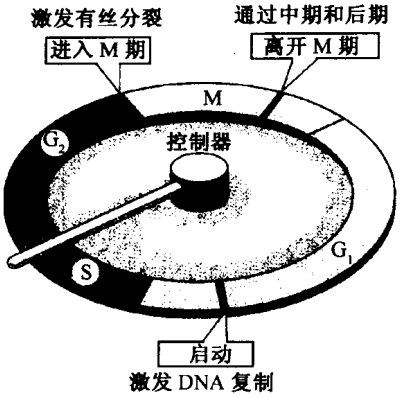


图 12-3　细胞周期控制模拟系统
（引自 Alberts *et al*., 1994）
细胞周期中的基本事件，如 DNA 复制、有丝分裂、胞质分裂都是通过中央的细胞周期控制系统控制的。中央控制系统如同一个顺时针移动的指针，当它到达某一位置时触发一个反应。

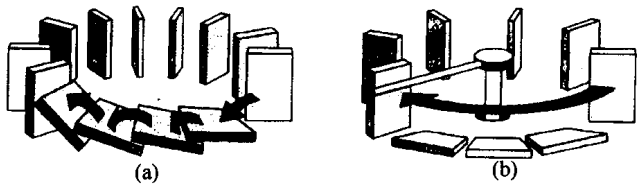


图 12-4　细胞周期调控的两种模式
（引自 Alberts *et al*., 1994）
骨牌代表细胞周期的基本事件，如 DNA 复制、染色体凝聚、纺锤体形成等。(a) 一个事件的发生触发下一个事件的发生；(b) 一个事件的发生并不意味着下一个事件必然发生，但可作为下一个事件发生的起因，这要通过控制系统进行调节。(b) 较 (a) 更为合理。

12.2.2　蛋白激酶在细胞周期调控中的作用

实际上，细胞周期的控制系统是一个典型的生化操作装置，这种装置是由一套相互作用的蛋白质组成，正是这些蛋白质间的相互作用，调控细胞周期的进程。

12.2.2.1　细胞融合实验

细胞周期的控制有两个主要事件，一个是对 DNA 复制起始的控制，发生在 G_1 期和 S 期之间。第二个事件是对染色体凝聚的控制，发生在 G_2 期和 M 期之间。1970 年，Colorado 大学的Rao和Johnson通过一系列的细胞融合实验打开了认识细胞周期中这两个事件的大门。

Rao 和 Johnson 想知道在细胞质中是否含有影响细胞周期活性的调节因子，他们用处于细胞周期不同阶段的同步化的细胞进行融合，看看结果会有什么不同。首先他们将同步培养的 G_1 期的 HeLa 细胞同 S 期的 HeLa 细胞进行融合，其目的是想了解 G_1 期的细胞中是否含有阻断 S 期细胞核中 DNA 复制的因子？还是在 S 期的细胞质中含有促进 G_1 期细胞 DNA 复制的因子？他们发现，G_1 期的细胞质受到 S 期细胞质的激活，开始了 DNA 复制，这一实验结果表明，正在进行复制的细胞的细胞质中含有促进 G_1 期细胞进行 DNA 复制的起始因子。与此相反，他们将 S 期的细胞与 G_2 期的细胞进行融合，发现 G_2 期的细胞核不能再启动 DNA 的复制，这表明，S 期的细胞质中的 DNA 复制起始因子对于已进行了 DNA 复制的 G_2 期的细胞核没有作用。

其他一些融合细胞实验得到了更有意义的结果。如将处于分裂期的细胞与处于细胞周期其他阶段的细胞融合，M 期的细胞质总是能够诱导非有丝分裂的细胞中的染色质凝聚，将这

种现象称为染色体超前凝聚（premature chromosome condensation，PCC）。由于 G_1 期、S 期和 G_2 期细胞中染色质的复制状态不同，PCC 的结果也不相同，如与 M 期细胞融合的 G_1 期的染色体为单线状，S 期为粉末状，G_2 期染色体为双线（图 12-5）。至于为什么 S 期的细胞与 M 期的细胞融合，早熟的染色体呈粉末状，其原因是正在复制的 DNA 易受损伤，是 DNA 断裂的结果。

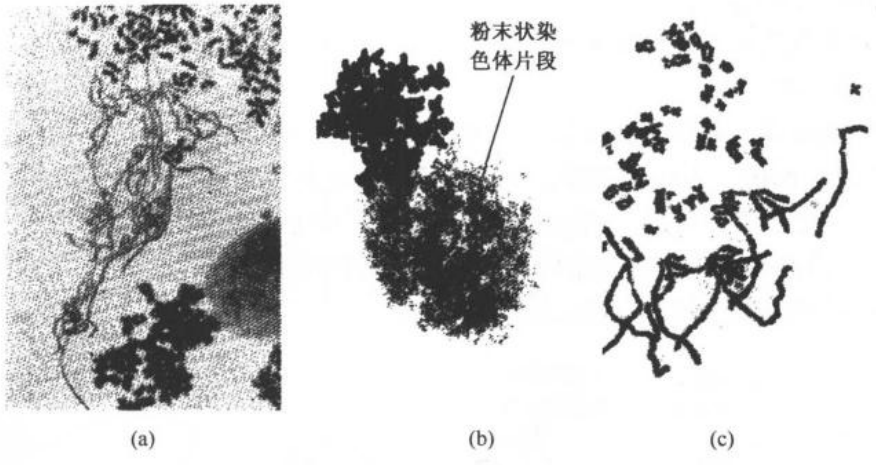


图 12-5　早熟染色体凝聚实验（引自 Karp，1999）

将同步化培养的 M 期 HeLa 细胞分别与间期不同阶段同步化的细胞融合，产生形态各异的早熟染色体。(a) M + G_1；(b) M + S；(c) M + G_2。

这些研究结果说明处于 M 期的细胞中一定有一种使染色体由松散状态凝聚成染色体的物质，即细胞周期调节因子的存在。

12.2.2.2　促成熟因子的发现

虽然细胞融合实验揭示了调节细胞周期的因子存在，但没有提供这些因子的化学本质是什么的信息。为了进一步研究促使 G_1 期细胞 DNA 复制以及诱导细胞提前进入有丝分裂的调节因子的本质，用蛙和无脊椎动物的卵母细胞及早期的胚进行了一系列的实验。一些动物的受精卵特别适合作为细胞周期的研究材料，因为这些卵细胞特别大，如蛙的卵细胞的直径可达 1 mm，并且在受精后进行快速胚胎发育，通过细胞周期进行分裂，产生许多小细胞。在每个细胞周期之间，G_1 期和 G_2 期很短，或没有 G_1 期和 G_2 期，但是都有 S 期和 M 期。在受精卵的发育早期，没有新基因的转录，因为胚胎早期发育阶段所需的 mRNA 和大多数蛋白质都是在卵母细胞形成时就合成好了并被包装在成熟的卵细胞中。另外在早期的细胞分裂周期中，细胞也不会生长，所有的细胞都是通过对称分裂形成两个小细胞。

在细胞周期的特定阶段分离蛙的卵细胞，并从蛙卵细胞中制备提取物。为了检测蛙卵提取物的生物活性，将它注射到非洲爪蟾的卵母细胞（未受精卵的不成熟的前体），观察这些提取物对细胞周期的影响。这种卵母细胞是检测提取物活性的良好系统，因为这种细胞已经完成了 DNA 复制并正好停留在第一次减数分裂的 M 期之前，如果注射物具促分裂活性，即可使注射的卵母细胞进入 M 期。因此卵母细胞所处的细胞周期阶段相当于周期细胞的 G_2 期。

在这些实验中，发现注射来自 M 期卵细胞中的提取物，可使卵母细胞进入 M 期。而用来自细胞周期其他阶段的提取物注射卵母细胞则不能诱导进入 M 期（图 12-6），这是首次发现在 M 期的细胞中有促进细胞分裂的因子存在，由于当时对这种因子的化学本质和作用机制都不清楚，只是简单地称为 M 期促进因子，后来称为促成熟因子（maturation promoting factor, MPF）。通过注射实验还发现，MPF 的活性在细胞周期中波动很大，在有丝分裂前急剧升高，但在有丝分裂后急剧下降直到零。

虽然 MPF 首先发现于蛙的卵细胞，但在实验过的所有动物细胞中都发现了 MPF，说明这种因子是普遍存在的。

由于 MPF 的纯化工作困难，所以对它的分离纯化研究了好几年，直到 1988 年才用柱层析从蛙卵中纯化了 MPF。几个实验室同时鉴定到 MPF 是由两个不同的亚基组成的异质二聚体（图 12-7），一个是催化亚基，它能够将磷酸基团从 ATP 转移到特定底物的丝氨酸和苏氨酸残基上，这种蛋白激酶后来被称为细胞周期蛋白依赖性激酶（cyclin-dependent kinase, CDK）；另一个亚基称作细胞周期蛋白（cyclin）。

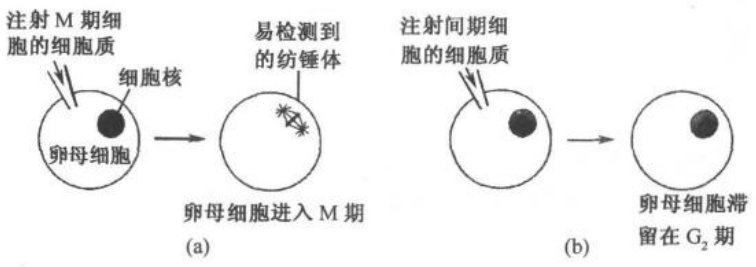


图 12-6　证明 MPF 活性实验（引自 Alberts *et al*., 1994）
(a) 用非洲爪蟾 M 期的卵细胞提取物注射非洲爪蟾的卵母细胞，促使卵母细胞进入 M 期，引起核破裂，并形成纺锤体。(b) 用细胞间期的提取物注射卵母细胞，不能促使卵母细胞进入 M 期。

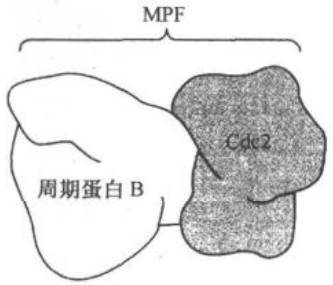


图 12-7　细胞周期蛋白－CDK 复合物的组成（引自 Cooper, 2000）

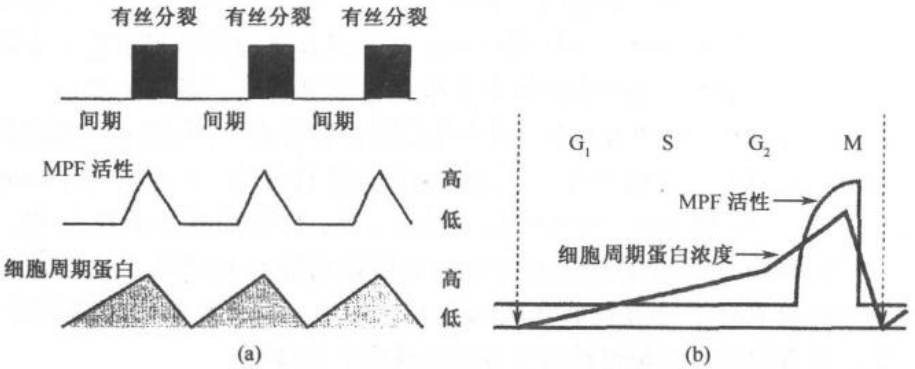


图 12-8　在细胞周期中细胞周期蛋白和 MPF 的波动（引自 Karp, 1999）
(a) 蛙胚细胞发生同步分裂时，早期发育的周期性变化。上部是有丝分裂和分裂间期的周期变化；中间曲线是 MPF 活性的周期性变化；下部曲线是控制 MPF 激酶相对活性的周期蛋白的浓度的周期性变化。(b) 在酵母的一次细胞周期中 MPF 的活性和周期蛋白浓度变化的对应关系。

MPF 蛋白激酶亚基不能单独起作用，它需要与细胞周期蛋白结合才有功能。之所以将另一个亚基称为细胞周期蛋白，是因为它们的浓度在细胞周期中是呈周期性变化的。同样，MPF 的活性与细胞周期蛋白一样在细胞周期中呈现周期性变化（图 12-8）。

当细胞周期蛋白的浓度降低时，蛋白激酶由于缺少与之结合的底物而失活。当细胞周期蛋白的浓度上升时，蛋白激酶被激活，促使细胞进入有丝分裂。这些结果表明：①细胞周期的进程依赖于一种酶的激活，而这种酶的惟一活性是使其他蛋白质磷酸化；②酶的活性受一种亚基的控制，它的浓度在细胞周期的不同阶段是不同的。

12.2.2.3 细胞周期蛋白的鉴定

在海胆的早期胚细胞中第一次鉴定到与 MPF 结合的细胞周期蛋白。同蛙胚一样，海胆的早期胚细胞是同步发生的，并同步进入有丝分裂。实验中将同步化的受精的海胆卵细胞培养在有放射性氨基酸的培养液中，每 10min 取样一次分离纯化蛋白质，然后通过凝胶电泳、放射自显影进行蛋白质分析。结果发现，经过几轮细胞周期之后，放射性标记的蛋白质的量稳定增加。其中有一种蛋白峰在有丝分裂的早期特别高，但是到了有丝分裂后期就急剧下降，然后在下一个细胞周期又慢慢积累直到有丝分裂前达到高峰，这种蛋白质后来被命名为细胞周期蛋白 B（cyclin B）。科学家用基因工程技术从海胆中分离了细胞周期蛋白 B 的 cDNA 克隆，然后用这种 cDNA 作探针从非洲爪蟾中分离了同源的细胞周期蛋白 B 的 cDNA 克隆，最后用周期蛋白 B 制备的抗体证明了非洲爪蟾中的 MPF 的一个亚基的确是细胞周期蛋白 B。

12.2.2.4 遍在蛋白质介导的细胞周期蛋白的降解促使细胞退出有丝分裂

有 3 种细胞周期蛋白激发非洲爪蟾卵母细胞的成熟：细胞周期蛋白 A 和两个结构相似的细胞周期蛋白 B。通过对不同来源的编码细胞周期蛋白的 cDNA 序列分析发现，所有这些蛋白质的氨基酸序列中，靠近 N 端都有一个称作破坏框（destruction box）的同源区（图 12-9）。

在细胞周期中，细胞周期蛋白在后期不久就开始降解，此时导致姐妹染色单体分开并被移向纺锤体的两极。通过对非洲爪蟾卵细胞提取物的生化分析表明，野生型的有丝分裂细胞周期蛋白合成之后，就有遍在蛋白质与之结合，然后通过多遍在蛋白化作用（polyubiquitination）将细胞周期蛋白进行标记以便蛋白酶体将周期蛋白迅速降解。

遍在蛋白质加到细胞周期蛋白上需要三种不同的酶介导。首先，遍在蛋白质在它的羧基端通过与遍在蛋白活化酶（ubiquitin-activating enzyme，E1）的半胱氨酸残基形成硫酯键而被激活；然后，遍在蛋白质从 E1 转移到 E2 的半胱氨酸残基，E2 称作遍在蛋白缀合酶（ubiquitin-conjugating enzyme，E2）；接下来，E2 和第三种酶，遍在蛋白连接酶（ubiquitin ligase，E3）一起将遍在蛋白转移到细胞周期蛋白的赖氨酸残基（共价结合）上进行多遍在蛋白化；最后，被多遍在蛋白化的细胞周期蛋白作为蛋白酶体的降解底物，被快速降解。E3 通常是一种复合体，由多亚基组成。例如从非洲爪蟾卵细胞中分离的周期蛋白 B 的 E3 至少含有 8 个不同的亚基。触发有丝分裂细胞周期蛋白多遍在蛋白化的 E3 又称为促后期复合物（anaphase-promoting complex，APC）。APC 激发 E2-遍在蛋白复合物同有丝分裂细胞周期蛋白破坏框结合，然后激发遍在蛋白质同破坏框 C 端的赖氨酸残基结合，此过程不断循环使多遍在蛋白化。通过基因操作构建了不含破坏框的细胞周期蛋白，这些蛋白质不会被降解。

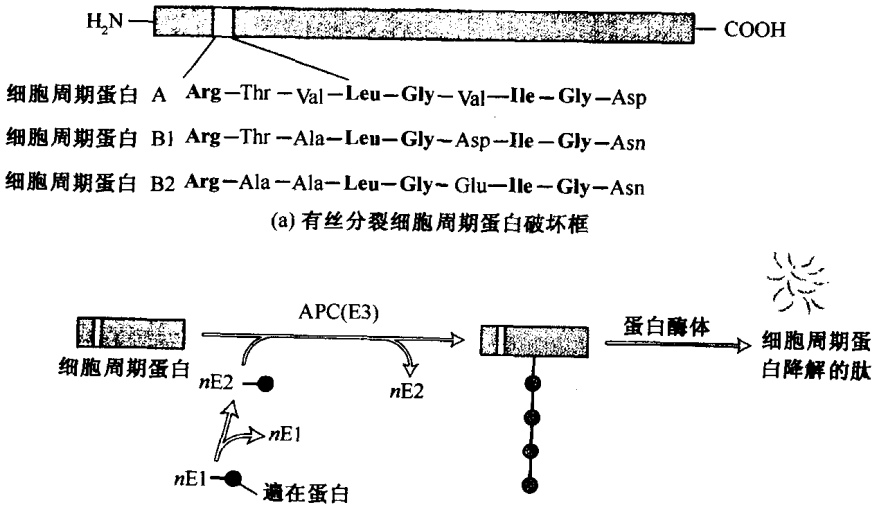


图 12-9 有丝分裂细胞周期蛋白多遍在蛋白化作用（引自 Lodish *et al.*, 1995）

(a) 所有的有丝分裂细胞周期蛋白在 N 端都有同源破坏框。图中给出了非洲爪蟾的三种有丝分裂细胞周期蛋白破坏框中的保守氨基酸残基（Arg、Leu、Gly、Ile、Gly）。非洲爪蟾和其他的脊椎动物都含有两种功能相同的 B 型细胞周期蛋白：B1 和 B2。有丝分裂细胞周期蛋白的分子质量为 60～63kDa，有 550～580 个氨基酸残基。(b) 后期末，多个遍在蛋白质分子同时加到细胞周期蛋白靠近 C 端破坏框的赖氨酸残基上，对细胞周期蛋白进行多遍在蛋白化，然后通过蛋白酶体复合物将细胞周期蛋白快速降解。

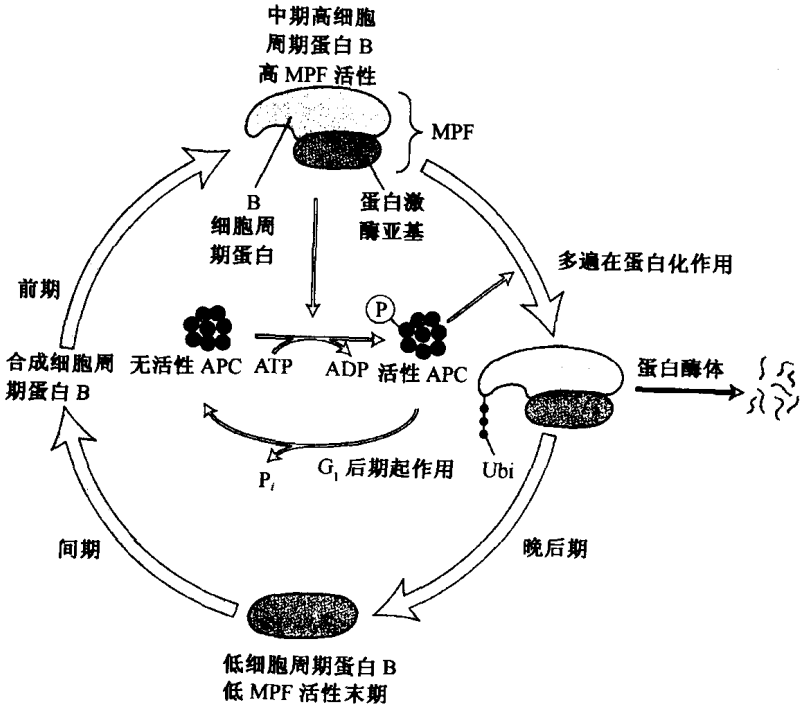


图 12-10 在周期细胞中有丝分裂细胞周期蛋白水平的调节（引自 Lodish *et al.*, 1999）

当 MPF 的活性很高时，APC 被激活。被激活的 APC 与 E2 结合，最后结合到细胞周期蛋白 B 的破坏框中，在那里进行多遍在蛋白化，其结果导致细胞周期蛋白 B 降解。MPF 活性降低，触发细胞进入有丝分裂末期。胞质分裂之后，细胞周期蛋白 B 在子细胞的间期合成，APC 的活性保持到 G_1 期的后期，被 G_1 期细胞周期蛋白与 CDK 复合物失活。

12.2.2.5 APC 的活性调节控制细胞周期蛋白 B 的降解

在有丝分裂的后期末，细胞周期蛋白 B 的降解是通过对 APC 活性的控制进行调节的。从阻断在中期的非洲爪蟾卵细胞中分离的 APC 对于激发细胞周期蛋白 B 的多遍在蛋白化的活性很低。相反，从具有正常细胞周期的非洲爪蟾的卵细胞中分离的 APC 具有较高的激发多遍在蛋白化的活性。分析表明具有较高活性的 APC 复合物中有几个亚基是被磷酸化的；用磷酸酶除去 APC 中磷酸化位点的磷酸基团，会降低 APC 的活性。为了解释 APC 的活性和作用，提出了一个模型（图 12-10）。

当 MPF 的活性在有丝分裂中期达到最高峰时，它将 APC 磷酸化并将其激活。接着发生细胞周期蛋白 B 多遍在蛋白化作用，引起细胞周期蛋白 B 的降解。由于细胞周期蛋白 B 是 MPF 的一个必需亚基，它的降解势必导致 MPF 的失活。在 G_1 期的后期，APC 失活，使得细胞周期蛋白 B 的浓度升高，同时提高 MPF 的活性，以便进入下一个有丝分裂期。由于细胞周期蛋白 B 在整个细胞周期中是连续合成的，这就合理解释了在细胞周期中细胞周期蛋白 B 的浓度在分裂间期不断升高，而在有丝分裂期又突然下降。

12.2.2.6 真核生物细胞周期调控的一般模型

在发现 MPF 后的一二十年中，细胞周期调控一直集中在对 MPF 样（MPF-like）的酶的研究，这类酶称为依赖于细胞周期蛋白的蛋白激酶，主要功能是控制细胞周期的进程；研究的生物也从蛙卵母细胞和胚胎转向酵母和培养的哺乳动物细胞，取得了很大的进展。图 12-11 就是根据这些进展提出的真核生物细胞周期调控的一般模型。

该模型总结了控制细胞周期三类主要的 CDK 复合物的作用，这三种复合物分别是：G_1 期、S 期和有丝分裂 CDK 复合物。当细胞被激活进入细胞周期时，首先是 G_1 CDK 复合物进行表达。准备进入 S 期的细胞通过激活转录因子，引起 DNA 复制所需酶类以及编码 S 期 CDK 复合物的基因表达。S 期 CDK 的活性开始被一种特异抑制物所抑制，而在 G_1 期的后期，G_1 CDK 复合物诱导 S 期 CDK 抑制物的降解，释放出有活性的 S 期 CDK 复合物。

活性 S 期 CDK 复合物通过将 DNA 预复制复合物中蛋白质的调节位点磷酸化，将 DNA 预复制复合物激活（预复制复合物是 G_1 期在 DNA 复制起点上装配的复合物）。这些被 S 期 CDK 复合物磷酸化的蛋白质不仅能够激活 DNA 复制起始，还能够阻止新的预复制复合物的装配，从而保证了每条染色体在细胞周期中只复制一次，进而保证了每个子细胞中的染色体数的稳定。

有丝分裂 CDK 复合物是在 S 期和 G_2 期合成的，但是它们的活性一直受到抑制直到 DNA 合成完毕。一旦被激活，有丝分裂 CDK 复合物就会诱导染色体凝聚、核膜解体、有丝分裂器的装配以及凝聚的染色体在中期赤道板上排列。在所有凝聚的染色体都与适当的纺锤体微管结合之后，有丝分裂 CDK 复合物激活后期启动复合物。这种多蛋白的复合物指导后期抑制物通过遍在蛋白介导的蛋白酶解作用进行降解，导致在中期将姐妹染色单体结合在一起的蛋白复合物失活。因此这些抑制物的降解作用，允许有丝分裂进入到后期。在此期间，姐妹染色单体分开分别进入有丝分裂的两极。在后期末，APC 也可诱导有丝分裂细胞周期蛋白的蛋白酶体的降解。有丝分裂 CDK 活性的降低，使得分离的姐妹染色单体去凝聚、核膜重新形成、胞

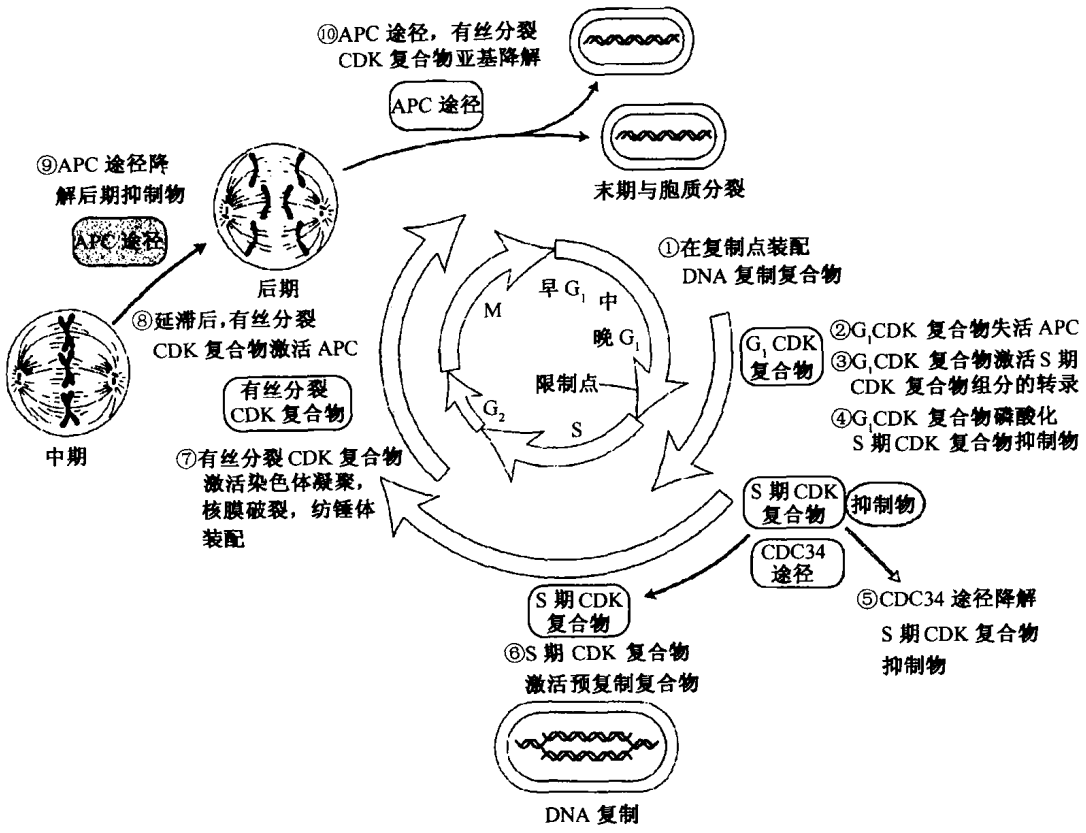


图 12-11　真核生物细胞周期调控模型（引自 Lodish *et al*., 1999）

细胞周期分别由依赖于细胞周期蛋白的 G_1、S 期和有丝分裂的蛋白激酶复合物所控制。这些蛋白激酶复合物都是由一个调节性的细胞周期蛋白亚基和一个催化性的依赖于细胞周期蛋白的蛋白激酶亚基所组成。在 CDC34 途径和 APC 途径中，CDK 复合物都是通过对一些特异底物，包括 S 期抑制物、后期抑制物以及有丝分裂细胞周期蛋白的多遍在蛋白化，并利用蛋白酶体将这些底物降解，进而调节细胞周期。

质分裂，最后形成子细胞。

在下一个细胞周期的 G_1 期早期，磷酸酶将那些预复制复合物的蛋白质去磷酸化，这样，这些蛋白质就可以在 DNA 复制区装配成复制复合物，准备进入 S 期。G_1 期 CDK 复合物在 G_1 期后期将 APC 磷酸化并使之失活，这样使得有丝分裂周期蛋白在 S 期和 G_2 期得以逐步积累。

细胞周期中 3 个关键的过渡，即 G_1 期→S 期、中期→后期、后期→末期及胞质分裂期，这些过渡都是通过触发蛋白质的降解进行的，所以是不可逆转的，这样迫使细胞周期只能沿一个方向行进。

在高等生物中，细胞周期的调控主要是调节 G_1 期 CDK 复合物的合成和活性，G_1 期 CDK 复合物的活性受催化亚基特异位点的磷酸化状态调节的。细胞生长因子是促分裂原（mitogen）能够诱导 G_1 期 CDK 复合物的合成和激活，一旦促分裂原作用了一定的时间，使细胞通过了晚 G_1 期的某一点，即使将促分裂原除去，细胞也会继续完成有丝分裂。晚 G_1 期的细胞分裂控制点被称为限制点（restriction point）。

12.2.3 裂殖酵母的细胞周期调控

通过非洲爪蟾卵细胞提取物的实验分析对细胞周期的控制有了一定认识，特别是发现MPF及其活性调节。裂殖酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）是低等真核生物，有完整的细胞周期（图12-12），通过对裂殖酵母的研究，对细胞周期的控制有了更深的了解。

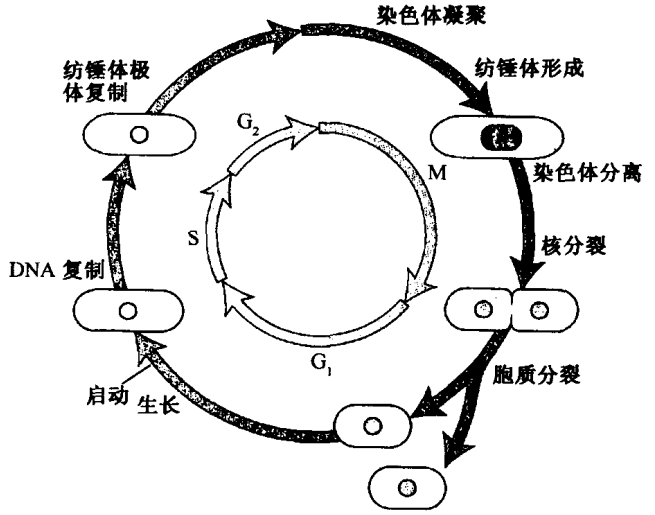


图12-12 裂殖酵母的细胞周期（引自 Lodish *et al*., 1999）

12.2.3.1 酵母的细胞周期基因突变

裂殖酵母是研究细胞周期的极好材料，因为酵母中与细胞周期相关基因的突变很容易被识别：如细胞的温度敏感突变，如果是非允许范围内的温度敏感突变，就会影响细胞的长度。已经分离了很多与细胞周期相关的温度敏感突变型，可分成两类：一类是 *cdc* 突变，这类突变在非允许的温度下培养，会滞留在细胞周期的某个阶段，结果会形成特别长的细胞；因为这类突变不能进入有丝分裂期，滞留在间期，所以能够继续生长。另一类称为 *wee* 突变，这类突变长得特别小。通过对这些突变体以及其他一些突变体的研究揭示了更多关于细胞周期调控的细节。

12.2.3.2 裂殖酵母的 MPF

裂殖酵母中几个温度敏感的 *cdc* 基因的隐性突变使得裂殖酵母在周期中不能进入 M 期，由于生长没有停止，所以比正常的酵母细胞长很多（图12-13）。这些基因中的一个显性突变，命名为 *cdc2*，使酵母出现 wee 表型。一般来说，隐性表型是因为缺少野生型的功能蛋白所致，而显性表型是因为增加了一些蛋白功能，导致调节失常。

对分离的 *cdc2*$^-$ 突变体的研究发现，该突变体没有 Cdc2 蛋白的活性，细胞不能进入有丝分裂，表明 Cdc2 蛋白是裂殖

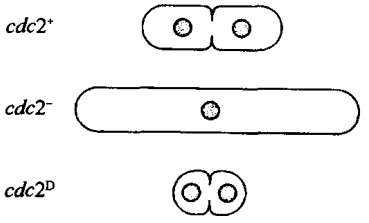


图12-13 裂殖酵母 *cdc2* 突变的表型（引自 Lodish *et al*., 1999）
cdc2$^+$是野生型，正常分裂；*cdc2*$^-$是隐形突变，产生特长的表型，*cdc2*^{D}是显性突变，产生 wee 表型，即因细胞特小不能分裂。

酵母进入有丝分裂的一个关键调节因子。通过基因工程克隆了 *cdc2*$^-$ 基因，序列分析表明该基因编码一个分子质量为 34kDa 的蛋白，该蛋白又称为 P34^{cdc2}。

后来在裂殖酵母中分离了另一个 *cdc* 基因，命名为 *cdc13*$^+$，该基因的产物 Cdc13 蛋白也是裂殖酵母进入有丝分裂必需的。序列分析表明该基因编码的蛋白质与非洲爪蟾和海胆的周期蛋白 B 同源。后来还揭示 Cdc13 蛋白和 Cdc2 蛋白能够形成异质二聚体，并且具有蛋白激酶的活性。另外还发现不仅 Cdc2 的蛋白激酶的活性随裂殖酵母的周期变化而变化，Cdc13 蛋白的浓度也随 Cdc2 蛋白的活性波动而波动。根据这些发现，可以肯定地说，裂殖酵母的 Cdc2-Cdc13 相当于非洲爪蟾的 MPF。

12.2.3.3 裂殖酵母的 MPF 活性调节

通过对其他一些 *cdc* 和 *wee* 突变体的研究，发现裂殖酵母的 MPF 的活性受其他一些基因编码产物的影响，如温度敏感突变体 *cdc25*$^-$ 在非允许的温度下也不能进入有丝分裂；另一方面，Cdc25 蛋白的超表达，将会缩短 G_2 期，使未成熟的酵母提前进入有丝分裂期。另一种突变体 *wee1*$^-$ 也会造成酵母体积不够大就提前进入有丝分裂，而 Wee1 蛋白的过量表达则延长 G_2 期，形成长的酵母细胞（图 12-14）。根据这些发现，推测 Cdc25 蛋白激活裂殖酵母的 MPF 的活性，而 Wee1 蛋白抑制裂殖酵母的 MPF 活性。

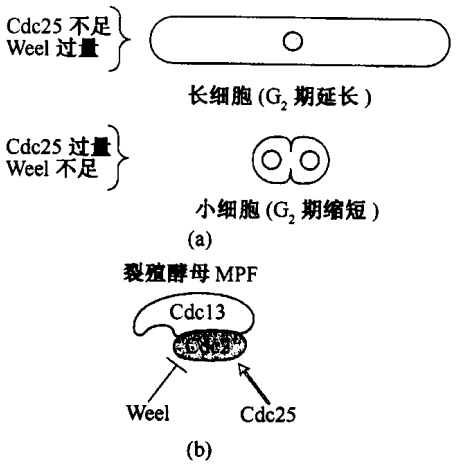


图 12-14 *cdc25* 和 *wee1* 基因的突变对裂殖酵母表型和 MPF 活性的影响（引自 Lodish *et al*., 1999）(a) Cdc25 不足、Wee1 过量与 Cdc25 过量、Wee1 不足，细胞的表型相反；(b) Cdc25 对 MPF 具有激活作用、Wee1 对 MPF 具有抑制作用。

进一步的研究发现裂殖酵母 MPF 的活性调节是相当复杂的，涉及多种蛋白激酶以及 Cdc2 蛋白亚基上两个位点的磷酸化与去磷酸化。Cdc2 蛋白亚基上有两个磷酸化的位点，一个是激活型的磷酸化位点，另一个是抑制型的磷酸化位点。独立存在的 Cdc2 蛋白激酶是无活性的，同周期蛋白 Cdc13 结合后，仍然没有活性，但此时的复合物成为两种蛋白激酶的底物，一种是 Weel 激酶，它使 Cdc2 亚基上的抑制位点 Tyr15（Y15）残基磷酸化，抑制 MPF 的活性。第二种蛋白激酶是 Cdc2 活化蛋白激酶（Cdc2-activating kinase，CAK），可以使 Cdc2 蛋白亚基中激活型的关键位点 Thr161（T161）残基磷酸化，这种磷酸化最大限度地激活了 MPF 的活性；但是，只要 Tyr15 残基是磷酸化的，Cdc2-Cdc13 复合物就没有活性。这种无活性的 MPF 称为前 MPF（pre-MPF）。要使 MPF 具有活性，需要 Cdc25 蛋白的作用，该蛋白具有蛋白磷酸酶的活性，能够将 Tyr15 的磷酸基团去除从而将 MPF 激活，诱导细胞从 G_2 进入 M 期（图 12-15）。不过，Wee1 蛋白和 Cdc25 蛋白的活性是相互竞争的，如果细胞生长得不够大，Wee1 的活性就强，有利于 MPF 的磷酸化；若细胞生长得够大，就有利于脱磷酸，促进细胞进入 M 期。

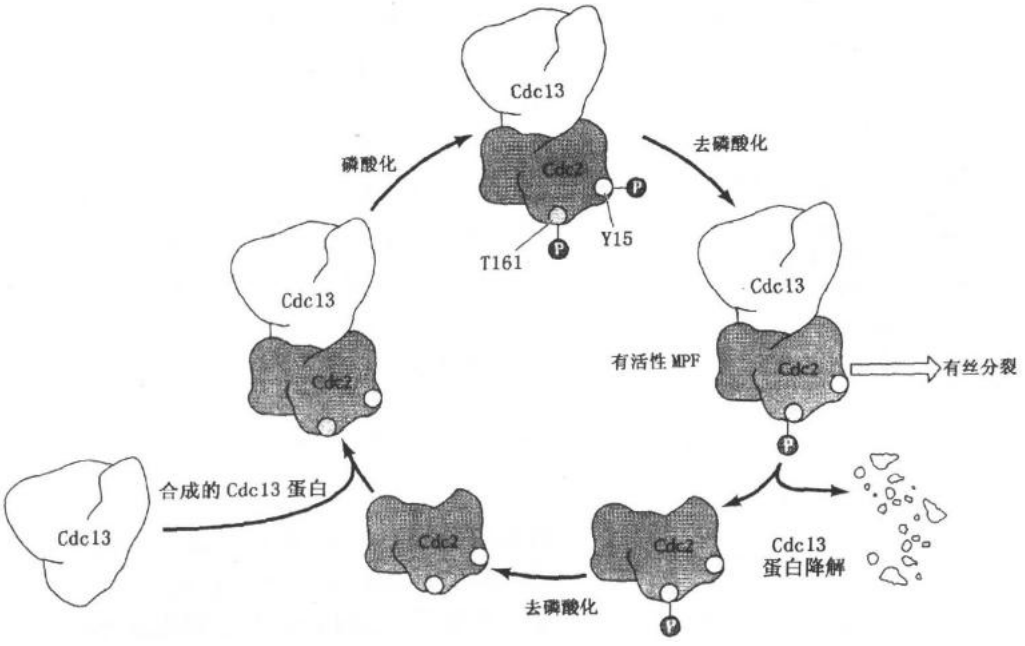


图 12-15　裂殖酵母中 MPF 的活性调节（引自 Cooper，2000）

12.2.4　芽殖酵母的细胞周期调控

芽殖酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）是以出芽的方式进行增殖的（图 12-16）。

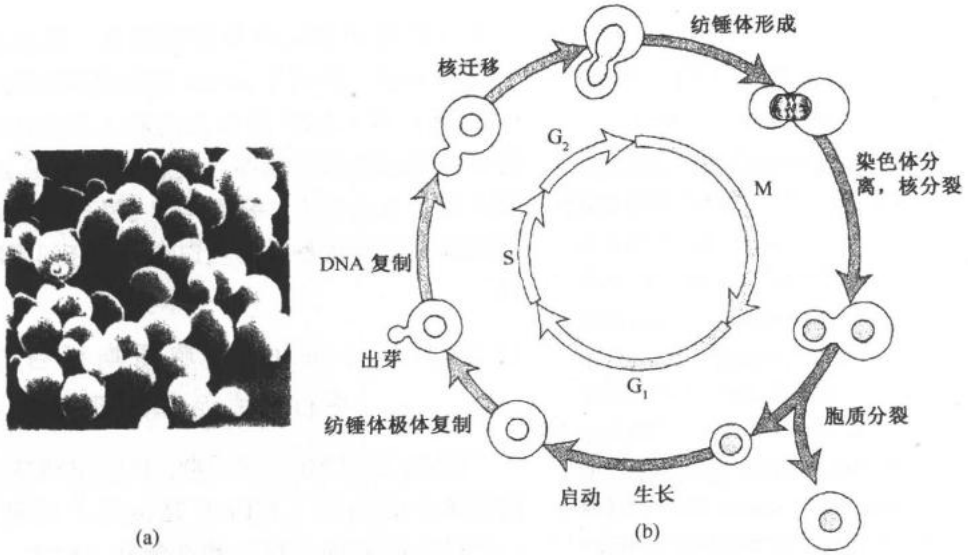


图 12-16　芽殖酵母的出芽（引自 Lodish *et al*.，1999）

(a) 处于细胞周期不同阶段的出芽酵母的电镜照片；(b) 芽殖酵母细胞周期的主要过程。

通过出芽形成的子细胞比母细胞小得多，它必须长到足够大才能进行分裂。当芽殖酵母在 G_1 期生长到足够大时，一些可导致进入 S 期的基因进行程序性表达。如果将处于 G_1 期的

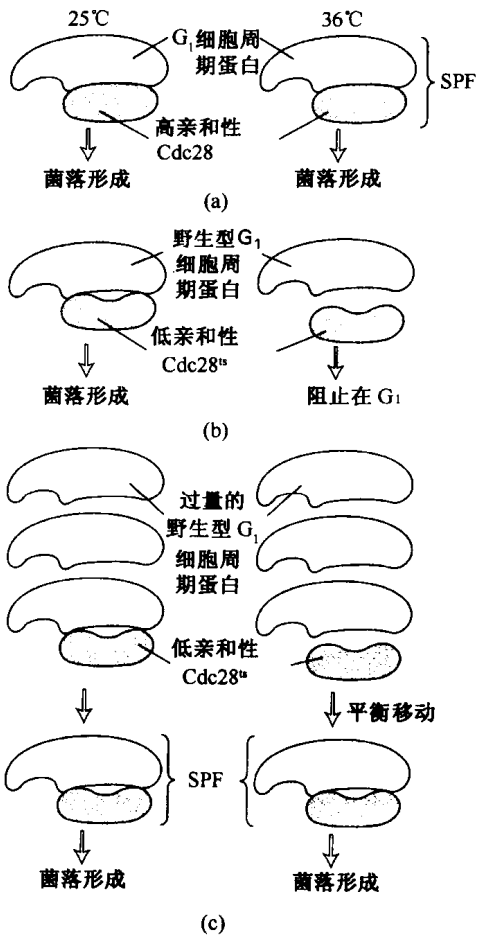


图 12-17　芽殖酵母 G_1 细胞周期蛋白基因的筛选（引自 Lodish *et al*., 1999）

(a) 野生型细胞能够产生高亲和力的 Cdc28 蛋白，这种蛋白在 25℃ 和 36℃ 下与 G_1 细胞周期蛋白结合形成 SPF；（b）某些 *cdc28*^{ts} 突变体表达的 Cdc28 蛋白与 G_1 细胞周期蛋白的亲和力低，在允许温度（25℃）能够形成足够的 $Cdc28^{ts}$-G_1 细胞周期蛋白（SPF），能生长并形成菌落；但是在非允许温度（36℃），不会形成 SPF、不会形成菌落；（c）用携带有 G_1 周期蛋白基因的高拷贝克隆载体转化 *cdc28*^{ts} 细胞，在 36℃ 下形成 3 种类型的菌落：一种含有野生型的 *CDC28* 基因，另两种含有基因 *CLN1* 和 *CLN2*，这两个基因编码的产物与有丝分裂细胞周期蛋白同源。在由 *CLN1* 和 *CLN2* 基因转化的细胞中，由于 G_1 周期蛋白的浓度很高，在36℃ 下能够形成足够的SPF，促使细胞进入 S 期，并进行有丝分裂。

细胞在它的体积尚未达到足够大时从营养丰富的培养基上转移到营养贫乏的培养基上，这些细胞继续维持在 G_1 期，并缓慢生长直到达到足够的体积才进入 S 期。但是，一旦 G_1 期的细胞体积达到足够大，就会启动细胞周期，即进入 S 期、通过 G_2 期、完成分裂期。即使此时将体积达到足够的细胞从丰富的培养基上转移到营养贫乏的培养基上也不能阻止细胞周期。通常将芽殖酵母在 G_1 期启动细胞周期的点称为起始（START）点。

12.2.4.1　芽殖酵母的 Cdc28 蛋白

在芽殖酵母中有一个基因命名为 *cdc28*，编码的蛋白质为 Cdc28，该基因的功能相当于裂殖酵母的 *cdc2*。*cdc28* 基因突变成温度敏感型就不会出芽，这表明 Cdc28 蛋白对于芽殖酵母进入 S 期具有关键作用。

根据对分离的野生型 *cdc28* 基因的序列分析推测，Cdc28 蛋白与已知的蛋白激酶同源。当将 *cdc28* 基因转入 *E. coli*，然后从 *E. coli* 中分离 Cdc28 蛋白，发现其具有蛋白激酶的活性。实际上，芽殖酵母中的 Cdc28 蛋白是第一个被分离的具有蛋白激酶活性的细胞周期蛋白。从裂殖酵母中克隆的 *cdc2*$^+$ 基因与 *cdc28* 基因是高度同源的，而 Cdc2 蛋白和 Cdc28 蛋白在功能上是相似的，芽殖酵母的 Cdc28 蛋白能够与裂殖酵母的 *cdc2*$^-$ 的突变型互补。由此看来，裂殖酵母与芽殖酵母都有一种细胞周期蛋白依赖性的蛋白激酶，它们能够相互替代。

12.2.4.2　3 种 G_1 细胞周期蛋白与 Cdc28 蛋白形成促 S 期因子

到 20 世纪 80 年代后期，已经很清楚地了解到促有丝分裂因子（MPF）是由两个亚基组成的，一个是细胞周期蛋白依赖性激酶（CDK），另一个是有丝分裂期的细胞周期蛋白，它可以激活催化亚基。与此相似的是，芽殖酵母含有促 S 期因子（S phase-promoting factor，SPF），它能够将 DNA 合成所需的蛋白质磷酸化并进行调节。与 MPF 相似

的是，SPF 也是异质二聚体，一个是 Cdc28 蛋白，另一个是在 G_1 期起作用的细胞周期蛋白。

为了鉴定芽殖酵母的 G_1 期细胞周期蛋白，研究者希望找到一个基因，当该基因高水平表达时，能够抑制某些温度敏感性 *cdc28*（*cdc*28^{ts}）突变体。这种方法的基本原理是：某些 *cdc28* 突变体可以是温度敏感的，这样，在非允许温度下突变的 Cdc28 蛋白与 G_1 周期蛋白的亲和力就低。在这种情况下，如果 G_1 周期蛋白的浓度足够高，它能够与突变的 Cdc28 蛋白形成足够的 SPF，促使细胞在非允许温度下进入 S 期。科学家通过基因工程方法分离到两个 G_1 细胞周期蛋白基因：*CLN1* 和 *CLN2*，它们能够按预测的方式抑制 *cdc28* 突变（图 12-17）。后来，科学家又分离鉴定了一个显性的 G_1 细胞周期蛋白基因：*CLN3*，是在野生型细胞中起作用的细胞周期蛋白基因。

12.2.4.3 Cdc28-G_1 细胞周期蛋白复合物的作用

一些实验表明，随着细胞的增大，Cdc28-Cln3 蛋白激酶活性被激活（机制尚不清楚）。一旦被激活，Cdc28-Cln3 磷酸化两个转录因子：SBF 和 MBF，并将其激活；这两种因子能够诱导 *CLN1* 和 *CLN2* 基因以及其他几种 DNA 复制所需基因的转录，包括编码 DNA 聚合酶亚基、DNA 连接酶的合成。

Cln1 和 Cln2 蛋白合成之后，分别与 Cdc28 结合形成 Cdc28-Cln1 和 Cdc28-Cln2 蛋白激酶复合物，这两种复合物能够将 APC 磷酸化并将其激活。激活的 APC 指导多遍在蛋白化并通过蛋白酶体降解后期抑制因子：酵母 B 型细胞周期蛋白以及纺锤体的组成成分，使细胞进入胞质分裂。但在芽殖酵母中，被 Cdc28-Cln1 或 Cdc28-Cln2 磷酸化的 APC 可以失活 G_1 后期的复合物，促使细胞进入 S 期。

12.2.5 哺乳动物细胞周期的控制

在多细胞的真核生物发育和生长过程中精确控制细胞的周期是决定组织大小和形态的关键。细胞的复制是受一种复杂的信号网络控制的，大多数细胞都是在细胞周期的 G_1 期转入 G_0 状态。某些分化的细胞，如成纤维细胞和淋巴细胞等能够在诱导条件下重新进入细胞周期进行分裂，但神经细胞不会再进入细胞周期进行分裂。

12.2.5.1 哺乳动物细胞周期具有限制点

限制点是哺乳动物细胞周期 G_1 期控制进入 S 期的调节点，相当于酵母的启动点。主要是通过体外细胞培养实验发现的。

哺乳动物细胞体外培养时，需要添加多肽生长因子促进细胞的分裂。如果缺少生长因子，就会被阻止在 G_0 阶段；一旦在培养基中添加了生长因子，这些细胞在 14～16h 后通过细胞周期限制点，再过 6～8h，细胞进入 S 期，并完成余下的细胞周期过程。若将这些细胞在完全通过限制点之前从含有生长因子的培养基转移到没有生长因子的培养基上，这些细胞不能进入 S 期，并不能完成细胞周期。但是，细胞一旦通过了限制点，这些细胞就能够进入 S 期并完成其后的细胞周期过程。由此推测，哺乳动物细胞周期的限制点相当于酵母的 START 点。

12.2.5.2 哺乳动物细胞周期受多种 CDK 和周期蛋白的调控

在裂殖酵母和芽殖酵母的细胞周期调控中，都是由单一的细胞周期蛋白依赖性激酶（CDK）调节的，而哺乳动物的细胞周期受一个小型 CDK 家族的调节。在哺乳动物细胞周期中起作用的 CDK，根据它们被发现的先后分别被命名为 CDK1、CDK2 、CDK3 等。人的 CDK1 是通过对 cDNA 克隆的鉴定发现的，该克隆的编码产物能够与裂殖酵母的 *cdc2*⁻ 互补，这种蛋白开始曾被命名为人的 CDC2。另外还发现人的 CDK2 的 cDNA 编码的产物能够同芽殖酵母的 Cdc28 突变体互补。后来又分别分离了 CDK3、CDK4、CDK5 和 CDK6 等。

如同芽殖酵母，在哺乳动物细胞中表达多种周期蛋白：细胞周期蛋白 A 和细胞周期蛋白 B 分别在 S 期、G_2 期和有丝分裂早期起作用，这两种细胞周期蛋白在所检查过的哺乳动物细胞中都存在。后来又发现了 D 型细胞周期蛋白和细胞周期蛋白 E。有 3 种不同的细胞周期蛋白 D，分别称为细胞周期蛋白 D1、D2 和 D3。细胞周期蛋白 D 的半寿期很短（30min），与 Cln 相似。细胞周期蛋白 D 和细胞周期蛋白 E 在 G_1 期表达。哺乳动物细胞中的 CDK 和细胞周期蛋白的种类及推测的作用时期列于表 12-2；图 12-18 则是它们的作用模式。

表 12-2 哺乳动物细胞细胞周期蛋白与细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶

时相	蛋白激酶	细胞周期蛋白	时相	蛋白激酶	细胞周期蛋白
G_2→M	CDK1	细胞周期蛋白 A、B	?	CDK3	?
G_1	CDK2	细胞周期蛋白 D1、D2、D3	G_1	CDK4	细胞周期蛋白 D1、D2、D3
G_1→S	CDK2	细胞周期蛋白 E	G_1	CDK5	细胞周期蛋白 D1、D2、D3
S	CDK2	细胞周期蛋白 A	G_1	CDK6	细胞周期蛋白 D1、D2、D3

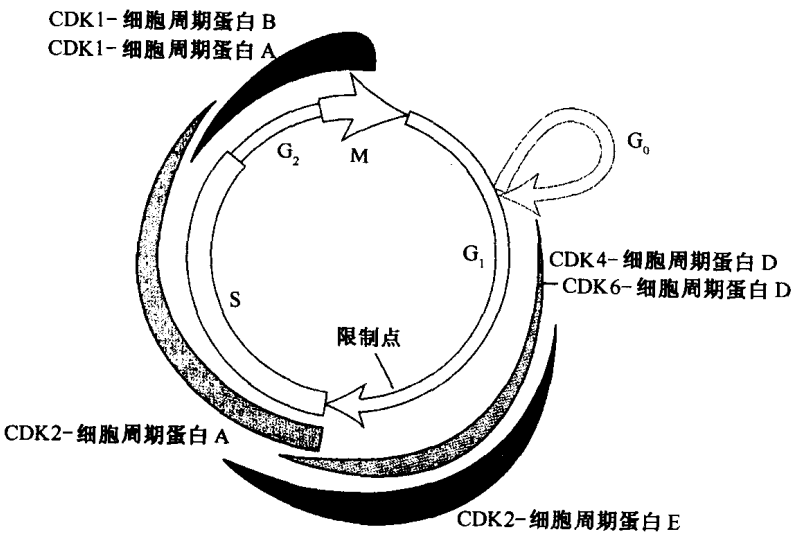


图 12-18 哺乳动物细胞周期调控的模式图（引自 Lodish *et al*., 1999）

处于静息状态的 G_0 细胞在生长激素的诱导下进入细胞周期，在不同的阶段受不同的 CDK-细胞周期蛋白的控制。

12.2.6 细胞周期的关卡

细胞周期的运转是十分有序的，是基因有序表达的结果。与细胞分裂有关的基因称为细胞分裂周期（cell division cycle，*cdc*）基因。这些基因表达的有序性，受到一些控制系统的监测。如酵母细胞在 DNA 合成开始的稍前有启动点，在哺乳类细胞中称为 R 点或限制点，亦称为关卡（check point）。这些关卡严格地监视着细胞周期事件的发生、发展过程是否严格按程序进行。如 DNA 损伤未修复前不能进入 S 期，S 期 DNA 合成未完成不能进入 M 期，如果 M 期的纺锤体和染色体连接不正常则不能进入后期。正是这一套监控系统保证了细胞周期的正常进行。

12.2.6.1 细胞周期中的 3 个主要关卡

在典型的细胞周期中，控制系统是通过细胞周期的关卡来进行调节的。控制系统至少有 3 个关卡：G_1 关卡（靠近 G_1 末期）、G_2 关卡（在 G_2 期结束点）、中期关卡（在中期末）。在每一个关卡，由细胞所处的状态和环境决定细胞能否通过此关卡，进入下一阶段（图 12-19）。

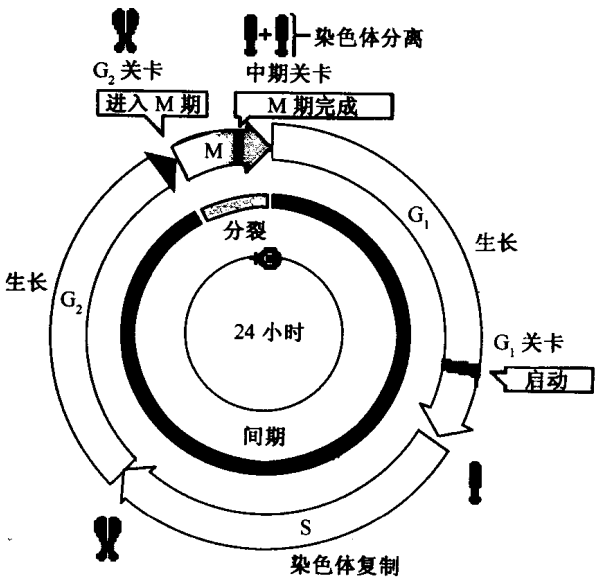


图 12-19 .细胞周期关卡及调节信息（引自 Alberts *et al*., 1994）

影响 G_1 期关卡的信息主要是新生的细胞生长的是否足够大、内部环境（包括 rRNA 和蛋白质的合成）是否合适。影响 G_2 关卡的因素有：DNA 是否正确复制和是否复制完全、细胞是否生长得足够大。中期关卡则是控制染色体是否完全分离。

G_1 关卡（启动点或限制点） G_1 关卡（在酵母中称 START，而在哺乳动物中称限制点或 commitment point）主要是监测细胞的大小和环境状态，如果条件合适，就会激发 DNA 复制，使细胞周期进程向前移动。在一些真核生物（包括哺乳动物和芽殖酵母）中，G_1 关卡是细胞周期的主要控制点，它决定着细胞能否分裂。至少涉及 6 个基因，其中一个基因（在裂殖酵母中称 *cdc2*，在芽殖酵母中称 *cdc28*）是所有真核细胞中都具有的，是控制细胞周期的关键，它也参与对 M 期的控制。

如果细胞被阻止在 G_1 期，可能会产生两种结果：一种是暂时停止生长，使 G_1 期延长，直到条件合适时再通过。另一种可能是使细胞进入 G_0 期，处于暂时静息状态。某些调控蛋白要暂时降解，使细胞不分裂。静息的 G_0 细胞要进入 G_1 期，必须受到某些分裂原的刺激（分裂原或是外部的或内部合成的）。然后合成某些必要的调控蛋白。某些静息的细胞不能进入 G_1 期。还有一个关卡就是 DNA 预复制的阻断，为了保证每一条 DNA 在细胞周期中只复制一次，一旦 DNA 进行了复制，细胞就会通过对预复制复合物的装配控制 DNA 的再复制，直到细胞分裂结束。

G_2 关卡　当细胞周期进行到 G_2 关卡时（G_2 关卡是裂殖酵母的主要关卡），控制系统检测细胞的大小、细胞所处的状态以及细胞内 DNA 是否复制完毕，如果这些条件合适，就会进入有丝分裂。

中期关卡　在中期关卡，控制系统监测所有的染色体是否都与纺锤体相连，并排列赤道板上；检测 MPF 是否失活了，否则不能进行有丝分裂和胞质分裂。

12.2.6.2 其他影响细胞周期的事件

事实上，细胞周期除了受 3 个主要关卡的控制外，还有其他一些事件影响细胞周期的正常进行（图 12-20）。

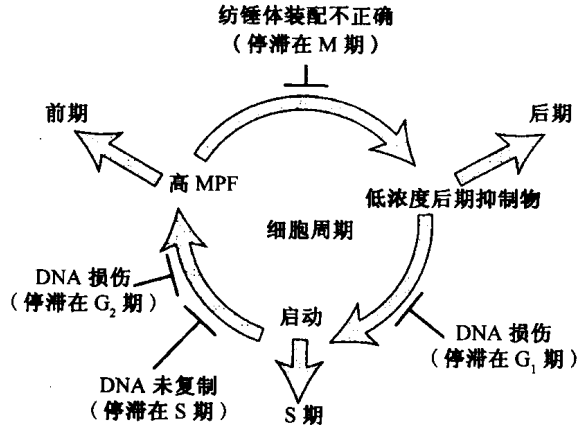


图 12-20　细胞周期的关卡和影响的事件（引自 Lodish *et al*., 1995）

由于射线或化学因素引起的 DNA 损伤，可阻止 G_1 期的细胞进入 S 期、G_2 期的细胞进入有丝分裂。有未复制的 DNA 也会阻止细胞进入有丝分裂。装配的有丝分裂的纺锤体有缺陷，或动粒与纺锤体微管的结合不正常等会阻止 APC 遍在蛋白聚合系统的激活，将导致后期抑制因子的降解，其结果使细胞不能进入后期，直到所有的动粒都与纺锤体微管结合。

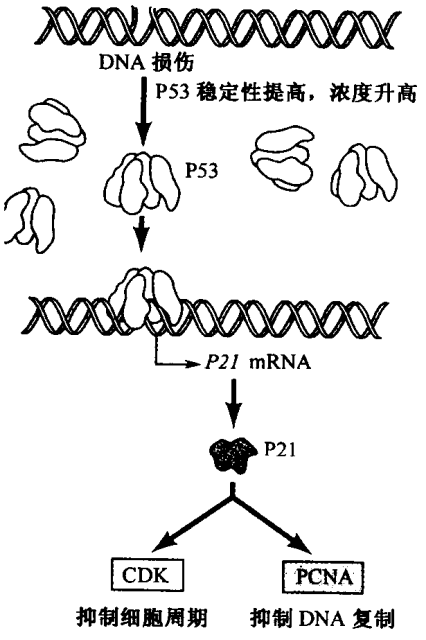


图 12-21　P53 蛋白在细胞周期调控中的作用（引自 Cooper, 2000）

在出现损伤 DNA 时，P53 作为转录激活因子诱导 *P21* 基因的表达，P21 蛋白能够同 CDK-周期蛋白复合物结合并将细胞阻止在 G_1 期或 G_2 期。同时，P21 蛋白与增殖细胞核抗原（proliferating cell nuclear antigen, PCNA），一种 DNA 聚合酶 δ 亚基的相互作用抑制 DNA 的复制。

DNA 复制不完全　没有将所有的染色体都复制的细胞不能进入有丝分裂。这种关卡的控制作用涉及未复制 DNA 的识别和 MPF 活性的抑制。目前关于参与该关卡的蛋白一点也不了解。不过，已经分离到有关该关卡缺陷的酵母突变体，相信对该突变体的研究将揭开细胞怎样识别未复制的 DNA 以及抑制 MPF 的激活。

纺锤体装配不正常　秋水仙素的作用是抑制微管的聚合、抑制有丝分裂纺锤体的装配，从而抑制细胞分裂，这说明在细胞周期中纺锤体装配是否正常也是一种关卡。在培养的细胞中添加秋水仙素，细胞能够进入有丝分裂，但被阻止在有丝分裂期，其时的染色体以凝聚的状态存在。

DNA 损伤　如果细胞中的 DNA 因 UV、γ 射线或化学修饰等引起的损伤，细胞也会被阻止在 G_1 期或 G_2 期，直到受损伤的 DNA 被修复。如肿瘤抑制基因 *P53* 能够将具有损伤 DNA 的细胞阻止在 G_1 期。P53 蛋白是一种转录因子，分子质量为 53kDa，在正常的条件下它非常的不稳定，因此不会积累到足够高的浓度与 P53 蛋白控制的因子结合以及激活转录。但是，受损伤的 DNA 可使 P53 蛋白稳定，导致浓度大大增加。此时能够激活编码 P21 蛋白的基因转录，该蛋白是一种细胞周期蛋白-蛋白激酶抑制因子（cyclin-kinase inhibitor，CKI），它能够与所有哺乳动物的 CDK-细胞周期蛋白复合物结合并抑制其活性。结果，细胞被阻止在 G_1 期（或 G_2 期），直到受损伤的 DNA 被修复以及 P53 蛋白和 P21 蛋白的水平下降（图 12-21）。

12.2.7　MPF 的作用机制

提高 MPF 的活性，可诱导细胞进入有丝分裂。由于 MPF 的一个亚基是周期蛋白依赖性的蛋白激酶，因此有理由推测，MPF 之所以能够诱导细胞进入有丝分裂，可能是 MPF 的蛋白激酶亚基将某些特异蛋白质磷酸化的结果。大量的研究工作表明，蛋白质的磷酸化和去磷酸化，同染色质的凝聚与去凝聚、有丝分裂的启动、核仁的功能、核膜的崩溃和重组等均有密切的关系。

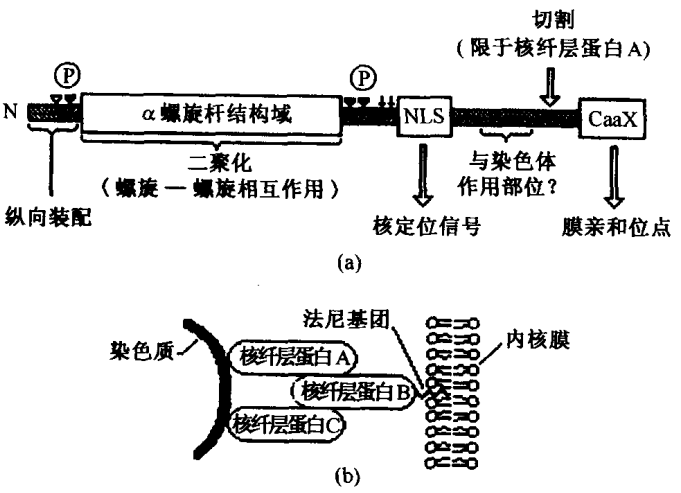


图 12-22　核纤层蛋白与核纤层结构（引自 Alberts *et al*., 1998）

（a）核纤层蛋白肽链的主要结构域；（b）核纤层的结构。

12.2.7.1 核纤层的磷酸化与核被膜解体

脊椎动物细胞中有 3 种类型的核纤层蛋白（A、B、C），核纤层蛋白 A 和 B 是由同一个转录单位编码的，通过可变剪接形成不同的 mRNA。它们在肽链上的差别是：核纤层蛋白 A 的 C 端比核纤层蛋白 C 的 C 端多 133 个氨基酸残基。核纤层蛋白 B 是由另一个转录单位编码的，通过转录后的修饰，在羧基端添加了疏水的异丙基，添加的脂肪酸帮助核纤层蛋白 B 插入到核膜的内脂层（图 12-22）。3 种类型的核纤层蛋白都以二聚体的形式存在，有球形的头和尾部结构域以及一个杆状的 α 螺旋中心。这些核纤层蛋白二聚体以头-头、尾-尾相接的方式形成核纤层。

在有丝分裂早期，MPF 使 3 种核纤层蛋白的特定丝氨酸残基磷酸化，引起核纤层的去聚合（图 12-23）。磷酸化的核纤层蛋白 A 和 C 被释放出来进入溶液中，而磷酸化的核纤层蛋白 B 由于异丙基的作用仍然与核膜相连。核纤层的解体，导致核被膜破裂形成小囊泡。

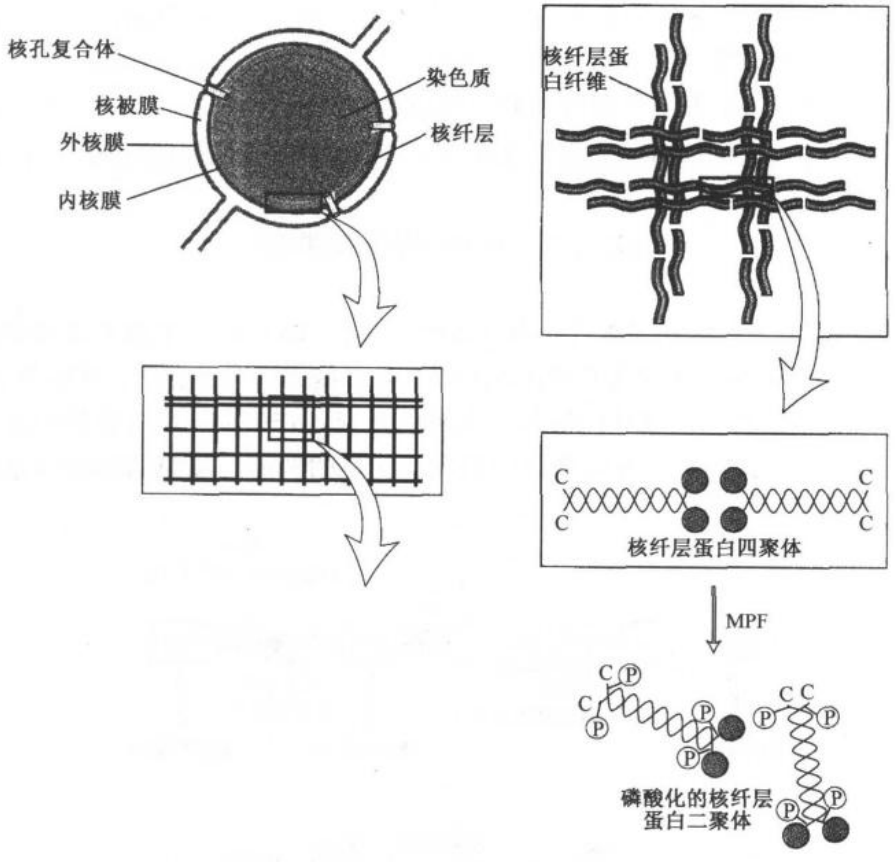


图 12-23 核纤层的磷酸化及去聚合（引自 Lodish *et al*., 1995）

12.2.7.2 MPF 参与多种有丝分裂早期事件的控制

研究表明，有丝分裂的一些早期事件都与 MPF 有直接或间接的关系（图 12-24）。

染色体的凝聚同 MPF 的蛋白激酶亚基的磷酸化作用有直接的关系。通过对芽殖酵母的研

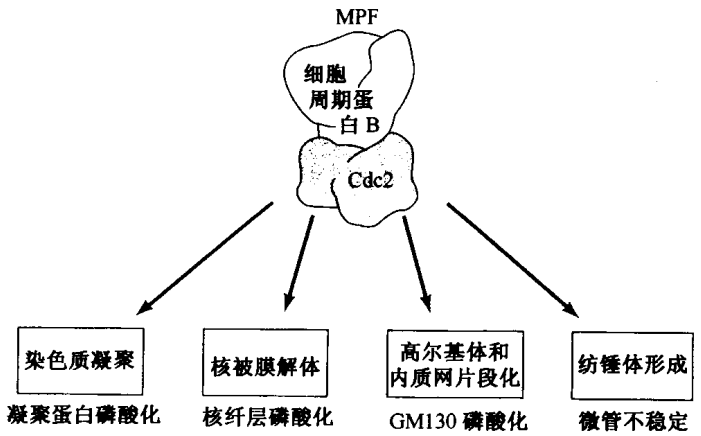


图 12-24　MPF 的作用目标（引自 Cooper, 2000）

究，鉴定了一个染色体结构维持（structural maintenance of chromosome, SMC）蛋白家族，这类蛋白质是染色体正常分离所必需的。从酵母中分离到一种使染色体凝聚的 SMC 家族的蛋白，称作凝聚蛋白（condensin）；用纯化的凝聚蛋白研究该蛋白在染色体凝聚中的作用，发现磷酸化的凝聚蛋白与 DNA 结合后，在水解 ATP 的条件下，DNA 能够缠绕凝聚蛋白形成超螺旋结构，凝聚蛋白须经 MPF 磷酸化而激活。根据这一结果，有人提出一种模型，解释 MPF 调控染色体凝聚作用的机制：被 MPF 激活的凝聚蛋白以及其他的一些蛋白质沿染色体骨架的一定间隔与 DNA 结合，使 DNA 片段超螺旋化从而使染色体凝聚。

在核被膜解体过程中，主要是核纤层蛋白的磷酸化直接导致核纤层的去聚合。

MPF 的磷酸化作用也参与了内质网和高尔基体破裂形成小囊泡，主要是通过对 GM130 的磷酸化。GM130 是介导 COPI 包被蛋白小泡着陆高尔基体所必需的蛋白质，它的磷酸化，阻止了 COPI 包被蛋白小泡着陆高尔基体并与之融合，进而使高尔基体和内质网断裂成片段。

至于 MPF 对纺锤体的影响，据认为 MPF 浓度的升高改变了微管的动力学行为。首先，微管解聚的速度加快，这样使微管快速去聚合并使间期微管缩短，微管去聚合是由于 MPF 使微管结合蛋白磷酸化所致。第二，形成的短的微管将成为中心粒的星微管，从而有利于纺锤体的形成。

12.3　有丝分裂

细胞分裂（cell division）是细胞增殖的方式。细胞有两种主要的分裂方式：有丝分裂（mitotic division, mitosis）和减数分裂（meiotic division, meiosis），通过有丝分裂产生两个含有相同全套染色体的子细胞；而减数分裂产生在遗传上有变异的单倍体细胞，用于有性生殖。

12.3.1　有丝分裂过程

有丝分裂是细胞周期的分裂期（M 期）进行的分裂活动。在这个时期，通过纺锤丝的形

成和运动，把在S期已经复制好了的DNA平均分配到两个子细胞，以保证遗传的连续性和稳定性。由于这一时期的主要特征是出现纺锤丝，故称为有丝分裂。

通常有丝分裂是指整个的细胞分裂而言，包括核分裂和胞质分裂两个过程，一般在核分裂之后随之发生胞质分裂。

M期持续的时间很短，但形态变化很大，根据形态变化的特征，通常将有丝分裂分为前期、早中期、中期、后期和末期（图12-25）。

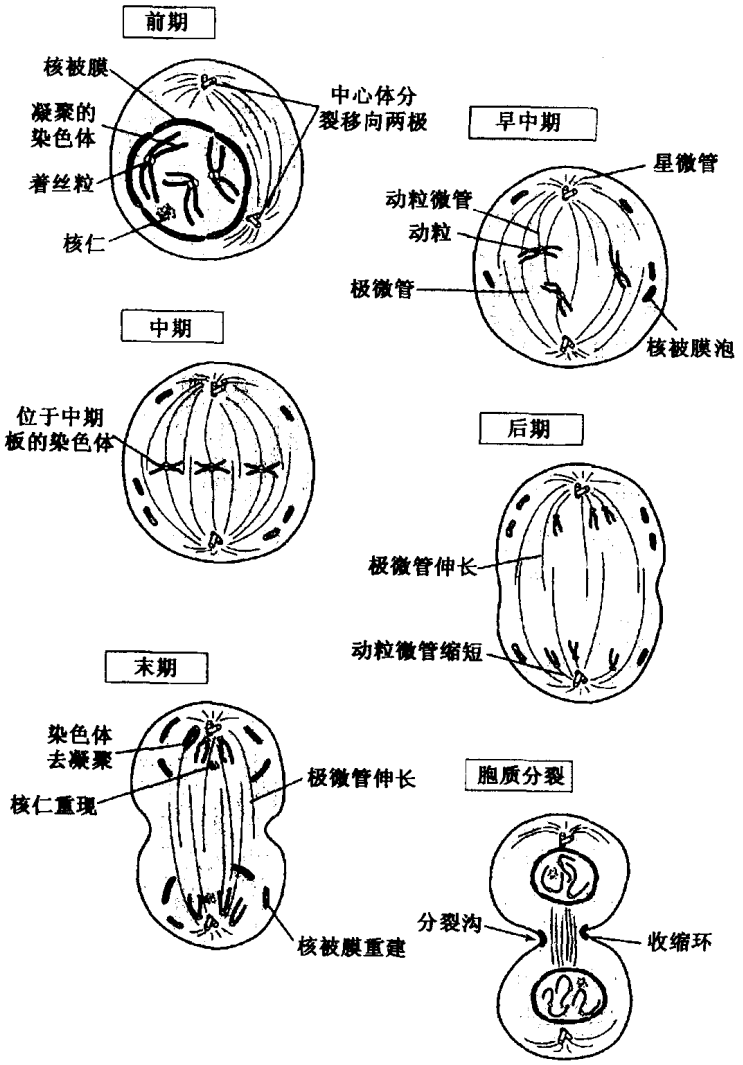


图12-25　有丝分裂过程（引自 Dudek，1999）

12.3.1.1　前期

前期（prophase）是有丝分裂的第一期，该期的主要特征是染色质凝聚成由完全相同的两条染色单体连接而成的具有明显特征的染色体。另外，核仁解体、核膜消失、细胞质中出现纺锤体也是前期的特征。

前期发生的主要事件有 4 种：染色体的凝聚、分裂极的确定、核仁的消失和核膜的解体。染色体凝聚是前期开始的第一个特征，实际上是染色体的螺旋化、折叠和包装过程。核仁消失和核膜解体是前期的另一个重要特征。前期末，核膜解体，核仁缩小消失，分散于胞质之中。

前面已经讨论过前期的起始主要是由 MPF 对一些特异蛋白质的磷酸化触发的。组蛋白 H1 也是被 MPF 蛋白激酶亚基磷酸化的蛋白之一，有实验表明，将 MPF 注射到 S 期的细胞后，组蛋白 H1 被磷酸化，染色体立即凝聚。

12.3.1.2 早中期

核膜解体后，细胞即进入早中期（prometaphase），此时期的主要事件是纺锤体（spindle)的装配。纺锤体是由微管装配而成的，功能是在有丝分裂期间将两套染色体均等分开。纺锤体微管的装配起始于中心体。

核周围的纺锤体侵入细胞核的中心区，一部分纺锤体微管的自由端最终结合到着丝粒上，形成动粒微管。前中期的特征是染色体剧烈地活动，个别染色体剧烈地旋转、振荡、徘徊于两极之间，并被纺锤体“捕获”：一侧纺锤体微管的自由端捕获住一条染色体的一侧的动粒，接着另一侧的纺锤体的自由端捕获了该染色体另一侧的动粒，这一过程是随机发生的。

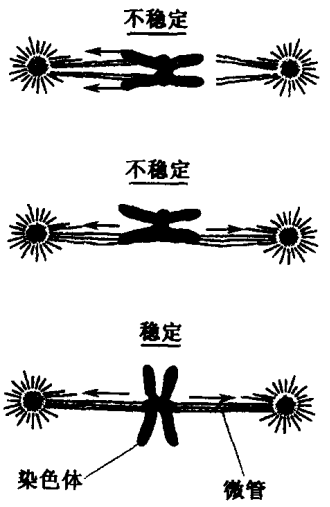


图 12-26 中期染色体动粒与两极纺锤体微管的结合
（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）
图的上部和中部显示的是纺锤体微管与染色体的不稳定结合；图的下部是稳定的结合，染色体的动粒只有与两极的纺锤体微管结合，两侧的作用力才会平衡。

12.3.1.3 中期

每一条染色体逐渐向纺锤体中心区移动，最终整齐排列在赤道板上。当两极的纺锤体微管分别同染色体的动粒结合，装配成动粒微管之后，即进入中期（metaphase)。染色体在纺锤体动粒微管的作用下，逐渐移向纺锤体的中心区，称为纺锤体赤道（spindle equator)。染色体移向赤道，是纺锤体动粒微管相互作用的结果，并且是染色体由不稳定状态向稳定状态转变的过程（图 12-26)。

12.3.1.4 后期

在后期（anaphase）的开始阶段，每一染色体的着丝粒在纺锤体微管的作用发生断裂，进而造成染色单体分开，并移向两极。几乎所有的姐妹染色单体都同时分裂。因此，这一时期的主要特点是：着丝粒分开，染色单体移向两极。

12.3.1.5 末期

后期结束，染色单体平均分到纺锤体的两极，核膜小泡重新包围两组染色体，相互融合形成完整的核膜，并在两极重新形成新的细胞核，此即末期（telophase)。该期的主要特点是：染色体解螺旋形成细丝，出现核仁和核膜。

12.3.1.6 胞质分裂及植物细胞壁的形成

M期的主要目的是进行核分裂，将复制的染色体均等分配到两个子细胞，在此期间也要涉及细胞中其他物质的分配，包括将细胞膜、细胞骨架、细胞器以及可溶性蛋白质等分配给两个子细胞，这是通过胞质分裂（cytokinesis），即将细胞质一分为二完成的。胞质分裂通常开始于有丝分裂后期，由MPF的失活所触发，直到两个新细胞核形成后才结束。动物细胞的胞质分裂是以缢缩和起沟的方式完成的：肌动蛋白和肌球蛋白装配成收缩环（contractile ring），通过滑动模型，使肌动蛋白收缩环紧缩，最终将细胞质一分为二（图12-27）。

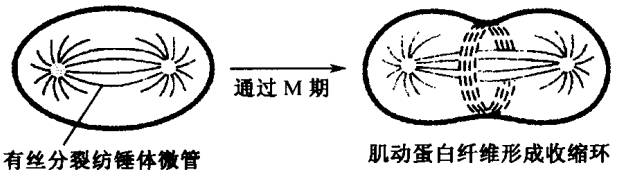


图12-27 胞质分裂

高等植物细胞的胞质分裂与动物细胞的胞质分裂完全不同，这是因为植物细胞有坚硬的细胞壁。植物细胞的胞质分裂不是靠肌动蛋白收缩环，而是靠细胞内新细胞壁的形成。新细胞壁的位置精确地决定了子细胞与相邻细胞的位置和关系。新细胞壁形成过程中，携带有细胞壁前体物质的高尔基体膜泡（其内充满细胞壁基质所需的多糖和糖蛋白），沿着微管运向有丝分裂的中期板，并相互融合形成大的、由膜包裹的、原盘状结构，其内含有的多糖装配成新细胞壁基质，称为初级细胞板（early cell plate），并不断向两侧扩大直到与原有的细胞质膜结合，同时也将细胞质分成两半（图12-28）。

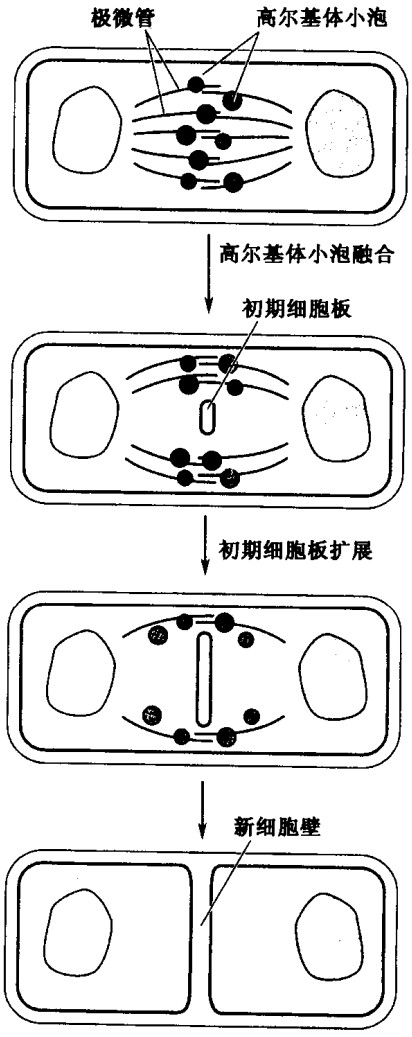


图12-28 植物的胞质分裂（引自Cooper, 2000）

12.3.2 有丝分裂的机制

有丝分裂的核心问题是如何均等分配遗传物质给两个新产生的子细胞，整个过程中的所有活动都是围绕这一核心问题进行的。染色体的分裂与分配是靠纺锤体的形成、运动和解聚来完成的。

12.3.2.1 纺锤体微管的类型及其形成

纺锤体又称有丝分裂器（mitotic apparatus），它是在有丝分裂期间，从中心粒形成的各种微管，包括动粒微管、极微管、星微管等（图12-29），它们的功能是将遗传物质均等分配到两个子细胞。

中期有丝分裂器的半数纺锤体微管源自极中

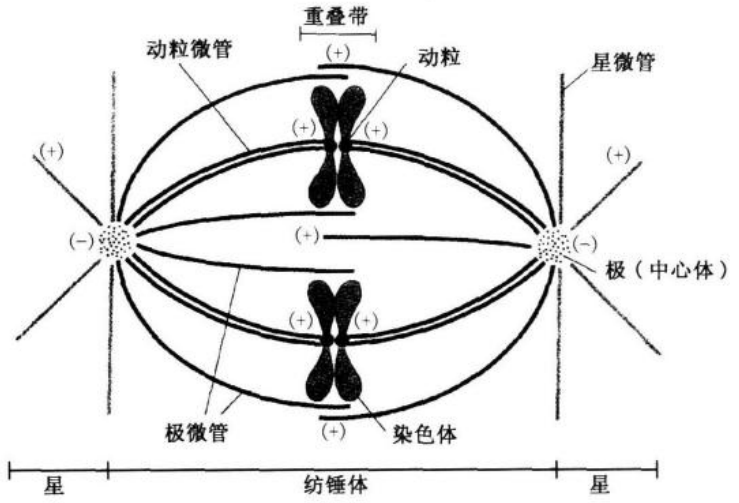


图 12-29　有丝分裂器的组成（引自 Lodish *et al*., 1999）

心体，因此，有丝分裂器的形成首先依赖于中心体的复制，并分别移动到两极。中心体在细胞周期中具有复制—分离—复制周期，这一过程称为中心体循环（centrosome cycle）。中心体循环始于 G_1 期（图 12-30），到 G_2 期时，两个子代中心粒达到了足够的长度，但仍处于同一个中心体内。至于中心粒的复制机制尚不清楚。动物细胞在有丝分裂期间，两对中心粒连同其组装的星体微管沿核膜彼此远离，达到相对位置时确定了分裂极，两极之间在靠近核膜处逐步形成纺锤体。

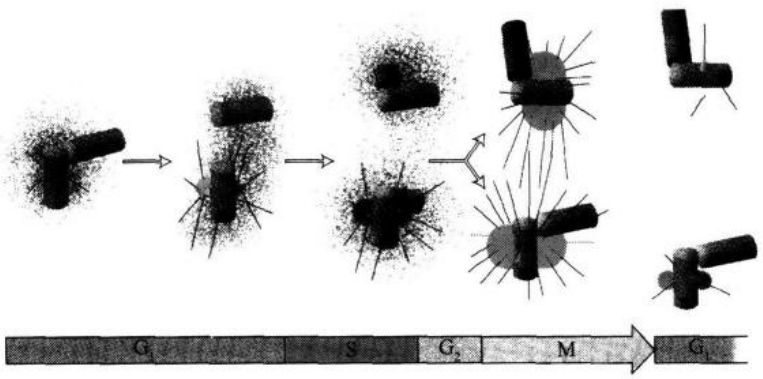


图 12-30　中心体的复制与细胞分裂的关系（引自 Lodish *et al*., 1999）

在 G_1 期，一对亲代中心粒分开；到 S 期和 G_2 期，子代中心粒从亲代中心粒上生长出来，并逐渐长大，但仍在同一个中心体中。有丝分裂早期，中心体裂开，每对中心粒移向细胞相反的两端，然后装配成有丝分裂器。

12.3.2.2　染色体分离的两个阶段：后期 A 与后期 B

在有丝分裂过程中染色体被拉向两极是受两种力的作用：一种是动粒微管去装配产生的拉力，另一种是极微管的聚合产生的推力。根据所使用的力，有丝分裂的后期可分为两个阶段：后期 A（anaphase A）和后期 B（anaphase B）。在后期 A，染色体运动的力主要是由动粒

微管的去装配产生的，此时的染色体运动称为向极运动。在后期 B，染色体运动的力主要是由极微管的聚合产生的，此时的运动称为染色体极分离运动（图 12-31）。

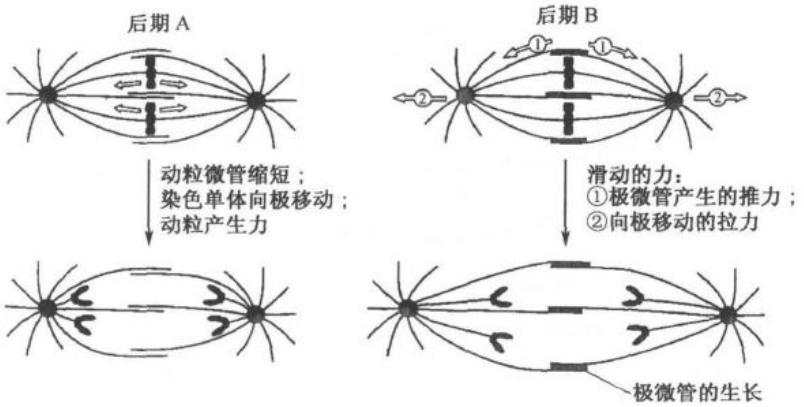


图 12-31　后期姐妹染色体被分开的两个过程（引自 Alberts *et al*., 1998）

12.3.2.3　纺锤体微管运动机制

从上面的讨论知道：染色体是靠向极运动和极分离运动进行分离的，关于这两种运动产生力的机制是不同的。

微管去聚合作用假说

主要是用于解释后期 A 向极运动而提出的一种模型。这一模型的要点是：动粒微管不断解聚缩短，将染色体拉向两极；解离下来的微管蛋白然后在极微管末端聚合，使极微管加长；合理利用细胞质中微管蛋白库的动态平衡，促使染色体分开。

这种模型可能的机制是：微管的正端插入动粒的外层，微管蛋白分子和动粒蛋白分子有亲和性，微管蛋白在此端可以去组装。在动粒中，ATP 分子水解可以提供能量，驱动微管上的动力蛋白向两极移动，结果是将染色体拉向两极（图 12-32）。

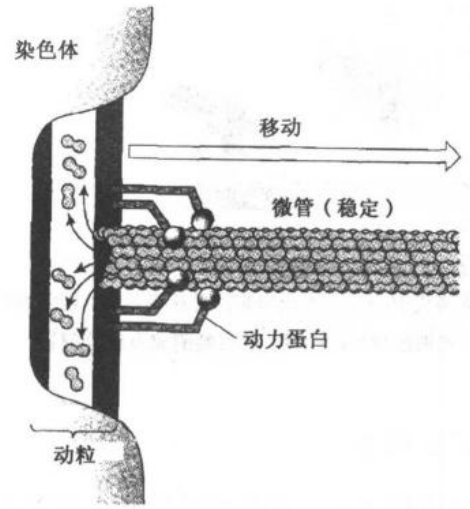


图 12-32　染色体向极运动的微管去聚合假说（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

纺锤体微管滑动假说

是关于后期 B 染色体极-极分离机制的一种假说，这种假说同动粒微管的去聚合假说完全不同。极-极分离是由极微管的两种不同类型的变化引起的。首先，极微管在正端添加微管二聚体进行聚合延长，使两极的极微管产生重叠带（overlap zone）。第二，极微管间产生滑动，形成将两极分开的力（图 12-33）。由于 ATP 能够诱导微管的滑动，说明纺锤体上结合有能够利用 ATP 产生力并驱动重叠极微管滑动的发动机蛋白。电子显微镜观察到微管表面

有突出的短丝伸到相邻的微管上，形成横桥（cross bridge），横桥上有较高的 ATP 酶活性，推测横桥是发动机蛋白，可在两极微管间产生滑动。由于两极微管的正端不断聚合，微管延长，重叠区保持不变，这样就不断将染色体推向两极。

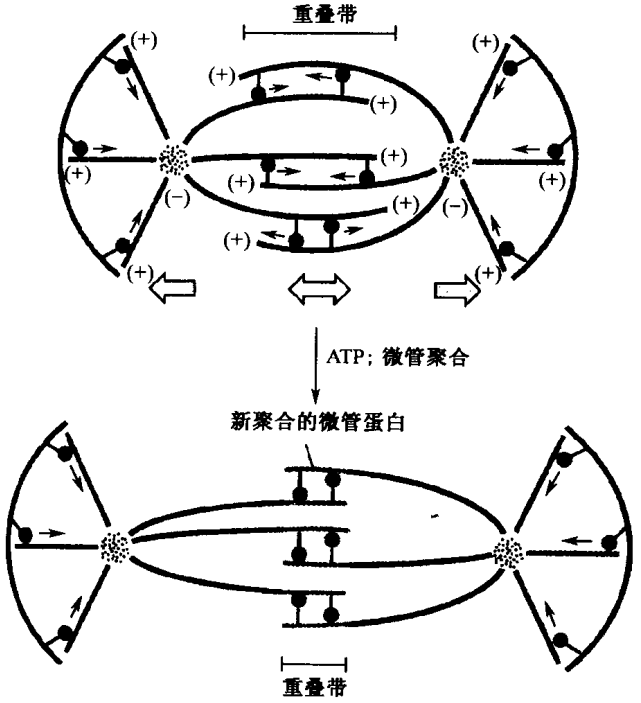


图 12-33　纺锤体微管滑动模型（引自 Lodish *et al*.，1999）

12.3.2.4　胞质分裂的机制

一旦染色体分离到细胞的两极，通过胞质分裂产生两个子细胞。所以细胞质分裂既是有丝分裂的最后一个过程，也是新细胞形成的开始过程。

胞质分裂的机制可用肌球蛋白与肌动蛋白之间的滑动模型来说明。肌动蛋白和肌球蛋白构成了胞质分裂的收缩环（图 10-63）。

收缩环是由一束肌动蛋白组成，肌动蛋白之间有肌球蛋白 II 的存在，通过肌球蛋白 II 基因的缺失或用抗肌球蛋白 II 的抗体处理分裂中的细胞证明参与胞质分裂的是肌球蛋白 II 而不是肌球蛋白 I。

在有丝分裂的早期，MPF 的活性升高，使肌球蛋白的轻链磷酸化，抑制了与肌动蛋白的结合。快到后期结束时，由于周期蛋白 B 的降解，MPF 失活，导致肌球蛋白轻链脱磷酸，结果，收缩机制被激活，形成收缩环，进行胞质分裂（图 12-34）。

12.3.2.5　核重建机制

核重建，首先要进行核被膜重建。解体的核被膜如何重新建立？通过对非洲爪蟾卵细胞提取物的研究和对各种生物温度敏感突变体的分析发现：核被膜的重建需要一些特异蛋白质

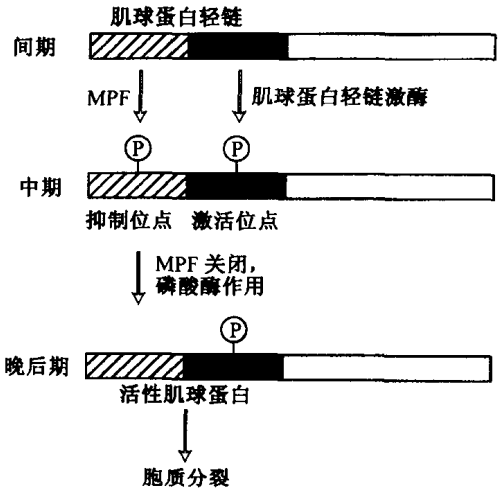


图 12-34　MPF 对肌球蛋白轻链的调节与胞质分裂（引自 Lodish *et al*., 1999）

在有丝分裂的早期，MPF 使肌球蛋白轻链的抑制位点磷酸化，阻止了肌球蛋白头部活性位点与肌动蛋白丝的接触和滑动，防止了胞质分裂的进行。在有丝分裂的后期，MPF 的活性下降，一个组成型的磷酸酶使抑制位点脱磷酸，胞质分裂得以进行。激活位点是在肌球蛋白轻链蛋白激酶的作用下被磷酸化的。

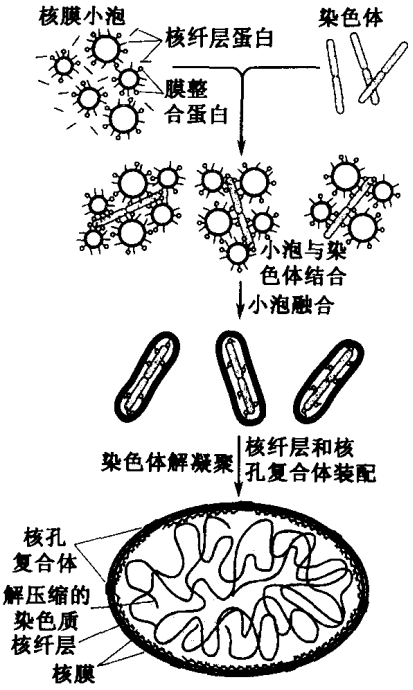


图 12-35　核膜的重建（引自 Cooper, 2000）

的磷酸化，这些蛋白质的磷酸化作用可能与 MPF 有关。在细胞周期的后期，当细胞周期蛋白 B 被降解之后，MPF 很快失活，但一些磷酸酶很快激活并将核纤层蛋白脱磷酸，导致核被膜的重建。

核重建是核解体的相反过程（图 12-35）。有丝分裂的后期，遍在蛋白质介导的蛋白酶解系统将 Cdc2 蛋白降解，使 MPF 失活。由于 MPF 失去活性，使得一些在有丝分裂开始被磷酸化的蛋白质去磷酸化，从而导致有丝分裂结束和核膜重建。后期末，子代染色体已经分成相等的两组，分别移到了纺锤体的两极。在有丝分裂的末期，前期核解体时形成的核被膜小泡此时又围绕染色体聚集和融合形成两个子代细胞核膜。在核被膜重建过程中，同样要重新装配核孔复合体。此外，前期磷酸化的核纤层蛋白经去磷酸化后重装配成核纤层。

核被膜重建之后，由于核解体而散布在细胞质中的核蛋白通过核定位信号经由核孔的选择性输入进入新的细胞核中。有了核被膜和核蛋白，染色体进行解凝聚，一些 rRNA 基因首先开始转录，一个生机盎然的细胞踏上了新的细胞周期之旅。

12.4　减数分裂

在细胞进行有丝分裂过程中，产生的两个子细胞含有来自亲代细胞的相同数目的染色体。因此，有丝分裂是细胞增殖，产生具有相同遗传特性的细胞群体的过程。在进行有性生殖的生物中，有性生殖是通过两个配子的融合产生新的生物个体的过程，这两个配子一个来自父

本（雄配子），另一个来自母本（雌配子），配子是通过减数分裂（meiosis）产生的。

12.4.1 减数分裂的一般特点

减数分裂是生殖细胞产生配子的分裂，包括两次连续的有丝分裂，形成 4 个单倍体的子细胞。相继的两次分裂分别称为减数分裂 I（或第一次减数分裂）和减数分裂 II（或第二次减数分裂）。在这两次分裂之间有一个很短的间歇期，但不进行 DNA 的合成，因而也不发生染色体的复制。由于细胞核分裂了两次，而染色体只是在第一次减数分裂前的间期复制了一次，所以细胞经过减数分裂导致染色体组数目减少一半。

第一次减数分裂可分为前期 I、中期 I、后期 I 和末期 I。第二次减数分裂可分为前期 II、中期 II、后期 II 和末期 II（图 12-36）。

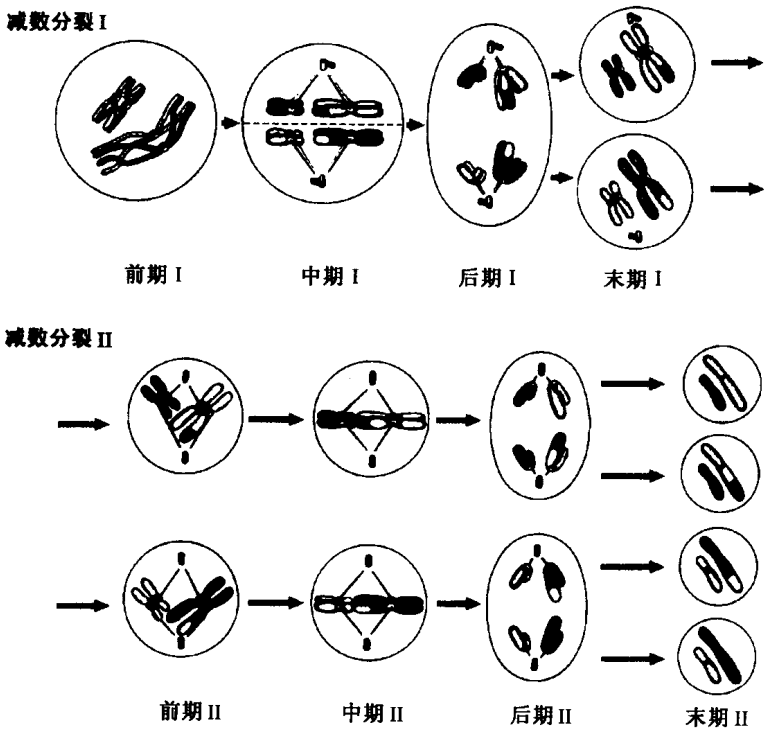


图 12-36 减数分裂过程（引自 Starr，2000）

12.4.2 减数分裂的主要类型

每种生物发生减数分裂的时间是恒定的，不同生物类群之间有显著差异。根据减数分裂在生物的生活史中发生的阶段和单倍体出现时期的不同，主要分为 3 种类型（图 12-37）。

配子或终端减数分裂

进行配子减数分裂（gametic meiosis）或称终端减数分裂（terminal meiosis）的生物包括所有的多细胞动物和很多原生生物，它们的减数分裂发生在配子形成过程中最后 2 次分裂

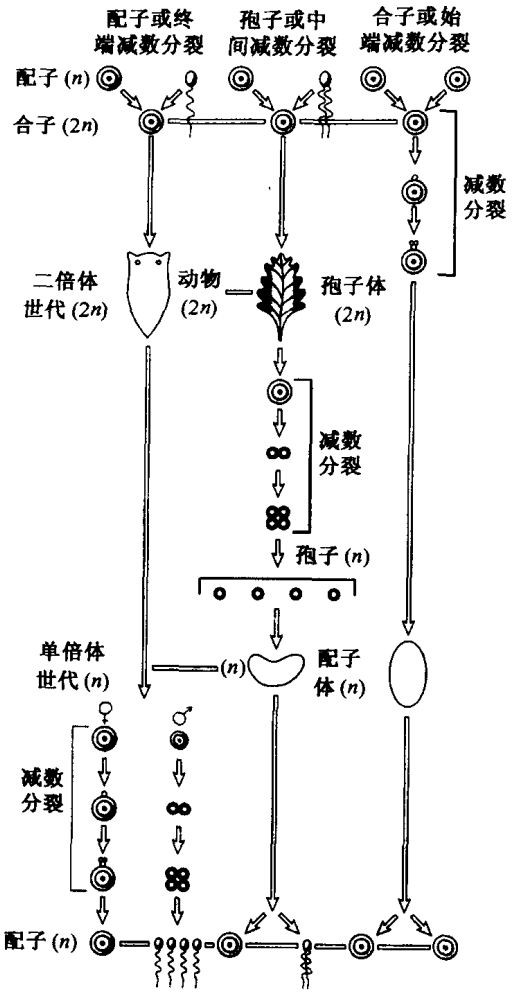


图 12-37　3 种类型减数分裂在生活史中发生阶段和单倍体出现时期的比较（引自 Karp, 1999）

(图 12-37 左)，因此这种类型的减数分裂是精子发生和卵子发生过程的一部分。例如，在雄性脊椎动物中，刚好在精母细胞分化之前发生减数分裂，精原细胞经过减数分裂形成初级精母细胞，然后再经过两次有丝分裂生成四个未分化的精子细胞（spermatid），每个精子细胞经过复杂的分化过程形成高度特化的精细胞(sperm cell)。在雌性脊椎动物中，卵原细胞形成初级卵母细胞，然后进入一个相当长时间的减数分裂期，在前期卵母细胞生长，扩充卵黄和其他物质。只有当卵细胞完全分化之后才发生减数分裂。脊椎动物的卵通常在减数分裂完成之前的某个阶段（中期 II）进行受精，受精之后减数分裂才完成。

合子或始端减数分裂

这类减数分裂仅存在于一些原生生物、真菌、很少数的藻类。它们只是在受精之后发生减数分裂（图 12-37 右），产生单倍体的孢子。孢子通过有丝分裂产生单倍体的子代。由于这种减数分裂是在配子融合成合子之后发生的，故称为合子减数分裂（zygotic meiosis）；又由于这种减数分裂发生在有性生活史的开始，故又称为始端减数分裂（initial meiosis）。

孢子或中间减数分裂

孢子减数分裂（sporic meiosis）或称中间减数分裂（intermediate meiosis）存在于所有的高等植物和一些藻类。减数分裂发生在一个既与配子形成无关、又与受精作用无关的阶段（图 12-37 中）。当雄性配子（如花粉粒）和雌配子（胚囊）结合形成二倍体的合子，二倍体的合子经过有丝分裂发育成一个二倍体孢子体(diploid sporophyte)。在孢子体发育的某个阶段，发生孢子生殖（包括减数分裂），产生能够直接发育成单倍体配子体(gametophyte)的孢子。单倍体的配子体通过有丝分裂产生配子。

12.4.3　第一次减数分裂

第一次减数分裂有两个主要特点（图 12-38）：①一对同源染色体分开，分别进入两个子细胞，同源染色体分开之前通常要发生交换和重组；②在染色体组中，同源染色体的分离是随机的，也就是说染色体组要发生重组合。

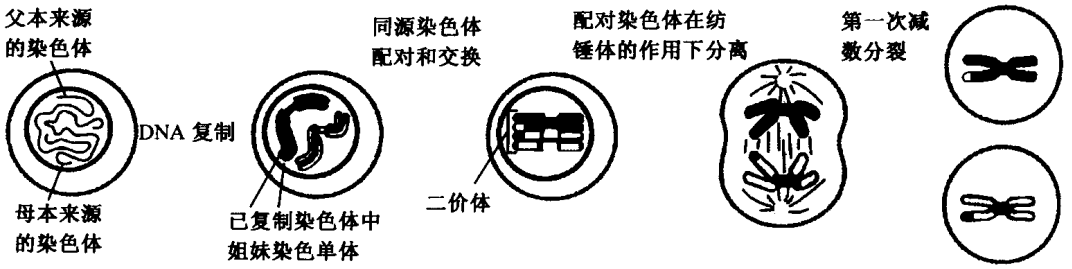


图 12-38　第一次减数分裂过程（引自 Alberts *et al.*，1994）

12.4.3.1　前期 I

第一次减数分裂的前期 I 变化最为复杂，呈现许多减数分裂的特征性变化，如持续时间长、细胞核显著增大、同源染色体进行配对、交换等。该期可分为细线期、偶线期、粗线期、双线期、终变期等（图 12-39）。

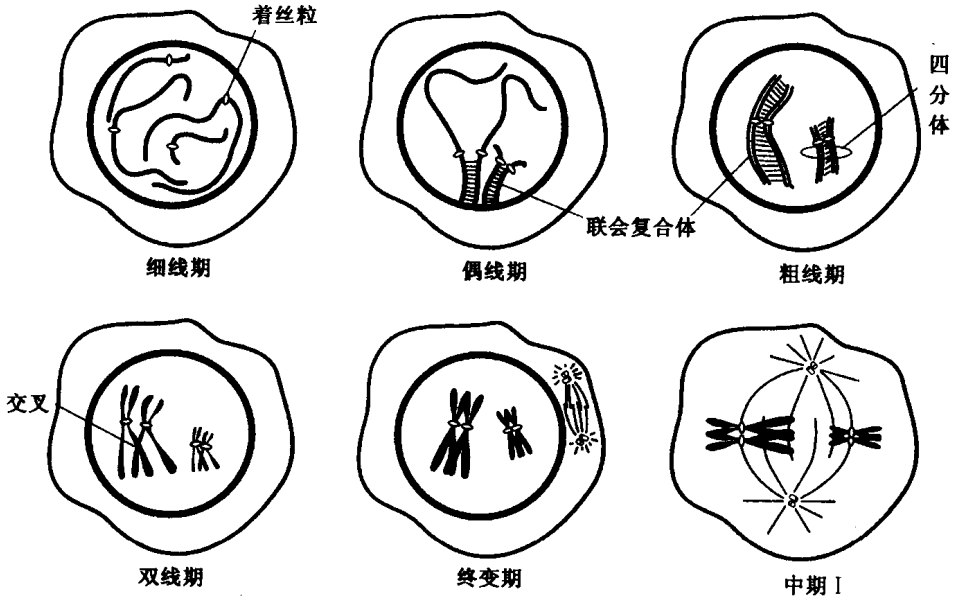


图 12-39　前期 I 的染色体行为（引自 Karp，1999）

细线期

细线期（leptotene stage）又称凝聚期（condensation stage），此期在光学显微镜下可逐渐见到染色体，染色质在凝聚前已复制，但仍呈单条细线状，看不到成双的染色体。但在电子显微镜下，可观察到此期的染色体是由两条染色单体构成的。

对玉米细胞的减数分裂的研究发现，玉米细线染色体的端粒开始是分布在整个细胞核中，在邻近细线期结束时，端粒定位到核膜的内侧。由于很多细线染色体的端粒与核膜结合，使染色体装配成花束状，所以细线期又称花束期。此期核的体积增大，核仁也较大，推测与 RNA、蛋白质合成有关。

偶线期

染色质进一步凝聚，同源染色体（homologous chromosome）发生配对，称为联会（synapsis），所以偶线期（zygotene stage）又称配对期（pairing stage）。配对从同源染色体上的若干接触点开始，进而像拉链一样迅速扩展到整个染色体所有的同源片段（图 12-40），并形成联会复合体（synaptonemal complex，SC）。

图 12-40　偶线期的染色体形态结构

关于联会的过程和机制至今尚不清楚，如同源染色体是如何相互识别的？什么时间开始识别？完全配对的同源染色体被称为二价体（bivalent）。同源染色体的相互识别是其配对的前提，推测染色体附着于核膜上可能与此相关。

粗线期

前期 I 的第三个阶段是粗线期（pachytene stage，pachynema），又称重组期（recombination stage）。该阶段开始于同源染色体联会之后，染色体明显变粗变短（至少缩短了 1/4），结合紧密，此期染色体形态是一个明显的四分体。

在粗线期，细胞中也存在 DNA 的合成，称为 P－DNA，交换过程中 DNA 链的修复、连接均与此相关。在粗线期核仁融合成一个大核仁，并与核仁形成中心所在的染色体相连。

细线期和偶线期一般持续几小时，而粗线期要持续几天或几周，甚至几月或更长。此期要发生染色体的交换重组，并可见到在 SC 的梯状结构中出现的重组节（recombination nodule）。

双线期

双线期（diplotene stage）的染色体长度进一步变短，SC 因发生去组装而逐渐消失，紧密配对的同源染色体相互分开，而在非姐妹染色单体之间的某些部位上，可见其相互间有接触点，称为交叉（chiasma）。交叉被认为是粗线期交换发生的细胞形态学证据，其数目决定于物种类型及染色体长度，如人类平均每对染色体的交叉数为 2～3 个；若染色体较长，则其交叉也较多。

此期的主要特点有：①SC 消失，染色体去凝聚，形成多个核仁并进行 RNA 活跃的合成，某些特殊的染色体合成于此期，如灯刷染色体；②二价体中两条同源染色体开始分开，但分开不完全，出现交叉，它是两条染色单体交换的结果（图 12-41）；③此期持续时间很长，几周、几月、几年都有可能。如：人卵母细胞的双线期就可持续 50 年之久。

终变期

终变期（diakinesis）又称再凝聚期（recondensation stage），是前期 I 的最后一个阶段，此期染色质又被包装压缩成染色体。双线期结束，染色体变成紧密凝聚状态，大多数核仁消失，四分体均匀地分布在核中。染色体交叉逐步向染色体端部移动，称为端化（terminalization）。最后四分体只靠端部交叉使其结合在一起，姐妹染色单体通过着丝粒连接在一起。

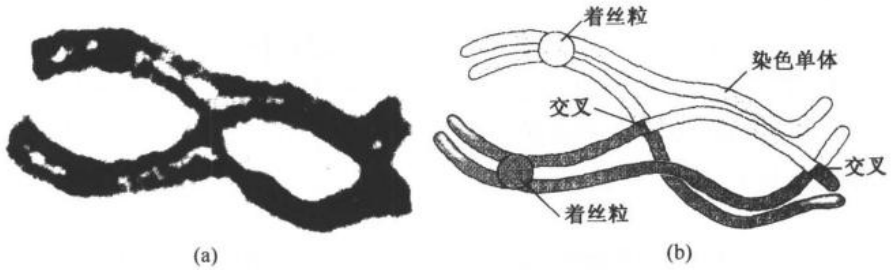


图 12-41　双线期的染色体交叉（引自 Hartl，1991）
（a）光学显微镜照片；（b）模式图，特别标出了交叉。

当前期即将结束时，像有丝分裂一样，中心粒已经加倍，中心体移向两极，并形成纺锤体，核被膜破裂和消失，标志前期 I 的结束。

12.4.3.2　中期 I

纺锤体侵入核区，分散于核中的四分体开始向四分体的中部移动；此时四分体上有 4 个着丝粒，一侧纺锤体只和同侧的两个着丝粒相连。最后染色体排列在赤道板上。

在大多数真核生物中，中期 I 仍然能够见排列在中期板上同源染色体的交叉，实际上，交叉能够将同源染色体作为二价体结合在一起。在人和其他脊椎动物中，每对同源染色体至少有一个交叉，较长的染色体通常有 2～3 个交叉。推测，可能有一种机制保证最短的染色体也有一个交叉。

12.4.3.3　后期 I

进入后期 I 后，同源染色体在两极纺锤体的作用下分开，并逐渐移向两极。由于每条染色体仍含有两条染色单体，因而每个极仍含有两套染色体。不同的同源染色体对向两极的移动是随机的，独立的，所以父方、母方来源的染色体此时会发生随机组合，即染色体组的重组，这种重组有利于减数分裂产物的基因组变异。

12.4.3.4　末期 I 及分裂间期

在末期 I，每一个极接受一套随机组合的染色体组。但在自然界中，有两种类型的末期 I，一种是没有明显可见的染色体去凝聚，另一种是完全逆转到间期核的状态。后者染色体要去凝聚、重新形成核被膜。两次减数分裂之间的时期称为分裂间期（interkinesis），是一个极短的时期。在动物中，处于分裂间期的细胞被称为次级精子细胞或次级卵细胞，因为它们只含有一套染色体，所以是单倍体；由于两个姐妹染色单体没有分开，实际上它们携带两套基因组。

12.4.4　第二次减数分裂

通过分裂间期即进入第二次减数分裂。第二次减数分裂分为前期 II、中期 II、后期 II、

末期 II，最后形成 4 个单倍体细胞。

如果在末期 I 重新形成了核被膜，则在前期 II 要将核被膜解体，重新进行染色体凝聚。在中期 II，染色体排列在赤道板，姐妹染色单体中的动粒被两极的纺锤体微管结合。在后期 II，着丝粒对称断裂，姐妹染色单体被拉向两极。在末期 II，染色体完全移到两极，开始去凝聚，并重新形成核膜。

12.4.5 减数分裂过程中的遗传重组及其机制

在减数分裂过程中发生了两种方式的遗传重组：同源染色体的部分交换和同源染色体分离时染色体组的自由组合。

12.4.5.1 同源染色体间的交换重组

同源染色体间的交换重组发生在第一次减数分裂的前期 I，是由于同源染色体配对形成联会复合体时发生的。

联会与联会复合体

联会是在减数分裂的偶线期两条同源染色体侧面紧密相贴并进行配对的现象。联会时的配对是专一性的，可以同时发生在同源染色体分散的几个点上。电子显微照片揭示，染色体联会伴随一种复杂结构的形成：联会复合体（SC）。

SC 是一种梯状结构（图 12-42），在电镜下可见其由 3 个平行的部分组成：两侧为侧生成分，电子密度较高，由约宽 10nm 的纤维组成，成分主要为 DNA，同时还包括 RNA 和组蛋白；两侧生成分之间，为电子密度较低的中间区，由横向排列的蛋白质纤维组成，主要成分为非组蛋白，在中间区的中间有一电子密集的梯状结构，仍由蛋白质纤维组成，称为中央组分。

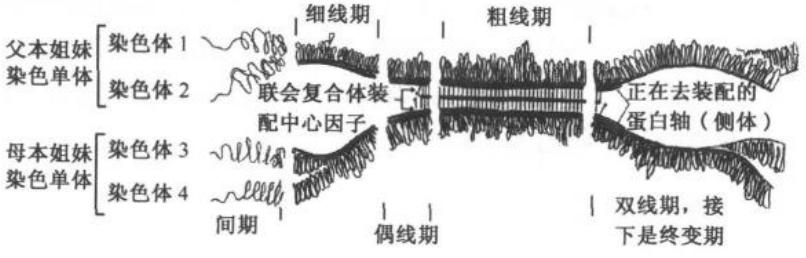


图 12-42 联会复合体的结构（引自 Alberts *et al.*, 1994）

多年来一直以为 SC 的作用是将每对同源染色体结合在一起，并促使伸进联会复合体中的 DNA 在适当的位置进行遗传重组。新的研究表明，同源染色体间的遗传重组并不需要联会复合体。不仅发现遗传重组之后才形成 SC，而且还发现了丧失 SC 组装能力的酵母突变体照样能够进行同源染色体间的遗传信息的交换。

实际上，同源染色体联会在细线期就开始了，在偶线期可以在光学显微镜下观察染色体的联会排列，在粗线期见到装配成的联会复合体。在双线期，联会复合体开始去装配，终变期时完全消失。染色体中的 DNA 进行遗传重组的第一步需要发生 DNA 分子的双链断裂，根

据对酵母的研究发现，断裂发生在细线期之前，先于同源染色体的配对联会，这表明在同源染色体配对之前就已经开始遗传重组。在大多数生物中，联会在每对同源染色体的一端开始，然后沿染色体向另一端延伸。

重组节

在电子显微镜下观察，发现在 SC 结构的中央有很多间隔不规则、电子密集的小体(图 12-43)。由于这些小体是交叉发生的部位，所以称作重组节（recombination nodule)。

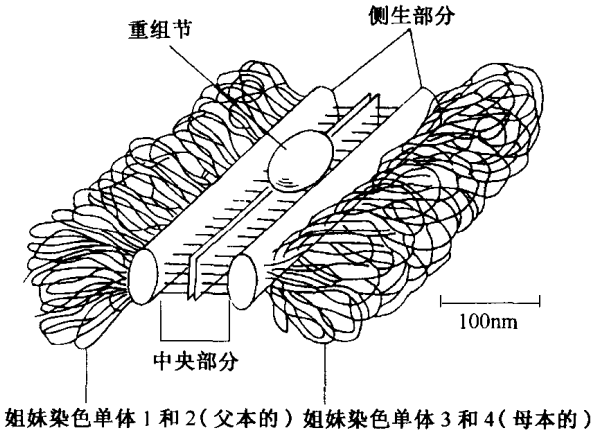


图 12-43　联会复合体中的重组节

重组节是同源染色体配对联会复合体中的球形、椭圆形或棒状的结节，直径约为 90nm，内含蛋白质，结构不清楚。重组节中含有催化遗传重组的酶类，因此推测某些重组节与染色体重组有关。

已发现，交叉与重组节在总的数量上是相等的，而在联会染色体上的分布方式上两者也极为相似。果蝇的某些突变引起了交叉分布的异常，重组频率因此降低，此时，可发现重组节不仅数量减少，分布也发生了变化，这也从另一个角度证明重组节与染色体交换的发生有关。

染色体重组——交换与交叉

在同源染色体联会期间，同源染色体要发生断裂和重接，在此过程中发生同源染色体间的交换，随着双线期的进行，交叉开始远离着丝粒，并逐渐向染色体臂的端部移动(图 12-44)，称为交叉端化（terminalization)。交叉是交换的结果，因为交换是在联会时发生的，即同源染色体紧密结合在一起时发生的，无法观察，所以观察到交叉时，同源染色体已

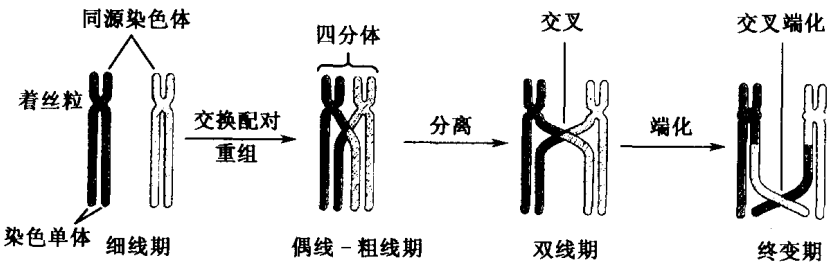


图 12-44　同源染色体联会时的交换和交叉（引自 Kleinsmith *et al*., 1995)

经完成了交换并开始分离了。

12.4.5.2 染色体组的重组合

生殖细胞在形成配子时，染色体要减半，由二倍体生成单倍体。二倍体中的两套染色体组分别来自双亲，但是在形成单倍体时，染色体组要进行重组合，也就是说在新形成的单倍体的生殖细胞中，每一套染色体组中既含有母本的染色体，也含有父本的染色体，它们是随机组合的，这样形成的配子基因型既不同于父亲又不同于母亲，而是一种新的组合，这是生物界遗传重组的主要方式。

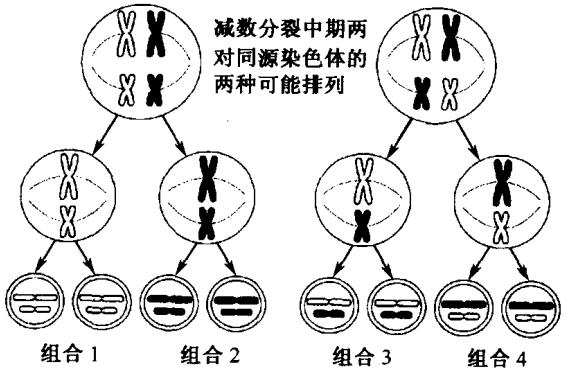


图 12-45 减数分裂中染色体组的自由组合重组
（引自 Campbell，1991）
1、2 是亲组合，3、4 是重组合。

染色体组的重组发生在减数分裂 I 的中期 I。此时染色体组中的每对同源染色体由于配对，所以在中期 I 的赤道板上的排列，就有两种可能的方式（图 12-45 中的小染色体），这样在一套基因组中由于染色体在赤道板上排列的随机性，就会有不同的自由组合方式，也就是重组。由于重组是随机的，重组的结果不一定都是有利的，要经过自然选择起作用。

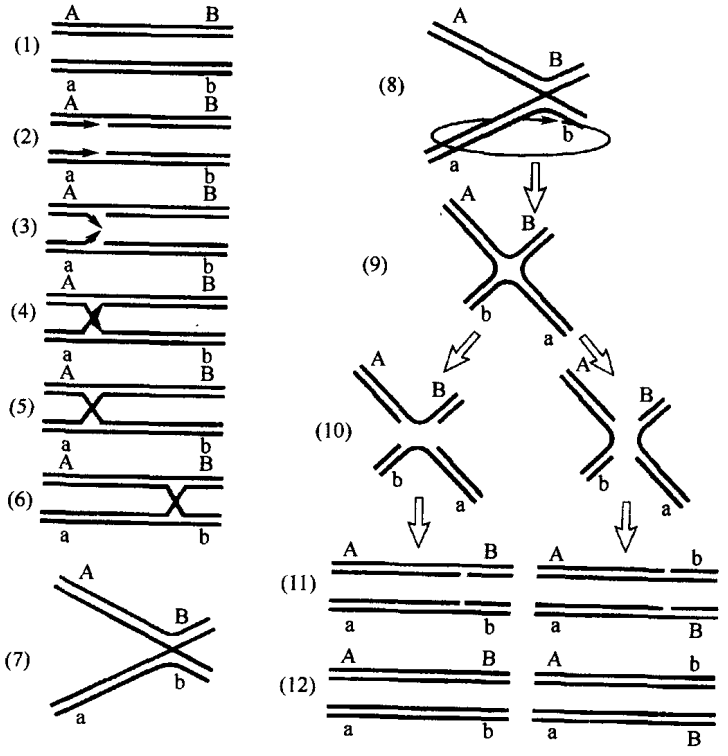


图 12-46 单链断裂重组的 Holliday 模型（引自 Karp，1999）

12.4.5.3 染色体断裂重接的分子机制

关于同源染色体在减数分裂 I 的前期 I 发生交叉的机制，提出了两种断裂-重接的重组模型进行解释。

单链断裂重组模型

在该模型中，同源染色体在联会期间，一对同源染色体中各有一条单链 DNA 断裂然后要发生重接；不过在重接的过程中发生了错误，不是原来断开的染色体重新连接起来而是交换连接，并且要通过一种 Holliday 中间结构的变化最后形成不同类型的重组体。在此过程中需要特殊的 DNA 重组蛋白：RecA 蛋白的参与。这一模型是 Holliday 提出的，所以又称为 Holliday 重组模型（图 12-46）。

双链断裂重组模型

在该模型中，一条染色体的两条链都发生了断裂，断裂是由内切核酸酶水解磷酸二酯键的结果。DNA 断裂之后由外切核酸酶扩大缺口。接着是断裂链的游离 3′端插入到具有完整双链的同源染色体中，形成 D 环结构。在 DNA 聚合酶的作用下，断裂两条链分别以完整链为模板开始合成。最后再通过断裂重接过程完成重组（图 12-47）。

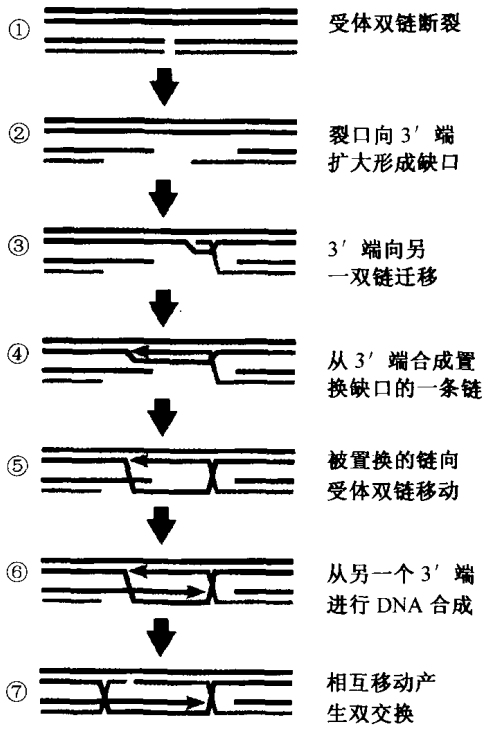


图 12-47 双链断裂重组模型（引自 Karp，1999）

12.4.6 减数分裂的生物学意义

12.4.6.1 减数分裂与有丝分裂的比较

减数分裂与有丝分裂的共同点都是通过纺锤体同染色体的相互作用进行细胞的分裂，但

二者之间有许多差异（图 12-48）。①有丝分裂是体细胞的分裂方式，减数分裂是生殖细胞产生配子的过程（生殖细胞也有有丝分裂）。②有丝分裂是一次细胞周期，DNA 复制一次，分裂一次，染色体由 $2n \rightarrow 2n$；减数分裂是两次细胞周期，DNA 复制一次，细胞分裂两次，染色体由 $2n \rightarrow n$。③有丝分裂中，每个染色体是独立活动；在减数分裂中，染色体要配对、联会、交换和交叉。④有丝分裂之前，经 DNA 合成，进入 G_2 期后才进行有丝分裂；减数分裂之前，DNA 合成时间很长（99.7%合成，0.3%未合成），一旦合成，即进入减数分裂期，G_2 期短或没有。⑤有丝分裂时间短，1～2h；减数分裂时间长，几十小时至几年。

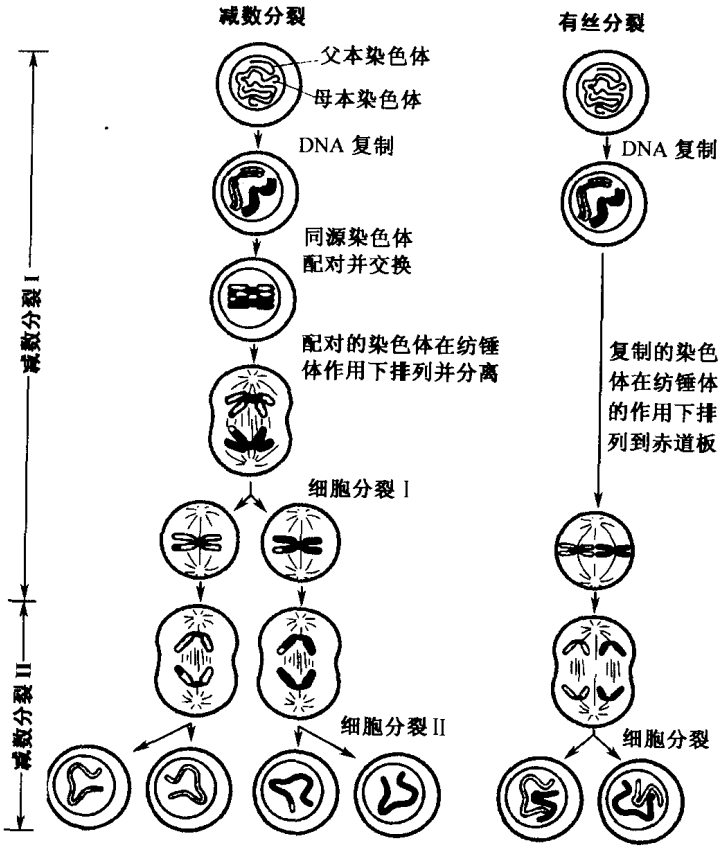


图 12-48　有丝分裂与减数分裂的比较（引自 Alberts *et al*., 1994）

12.4.6.2　减数分裂的生物学意义

有性生殖是生物在长期进化历程中较无性生殖更为进步的一种繁殖方式。雌雄配子的融合，把不同遗传背景的父母双方的遗传物质结合在一起，其结果既稳定了遗传，又添加了诸多新的遗传变异，大大增强生物对千变万化环境的适应能力。然而，如果没有一种机制使精卵细胞染色体数减少一半，那么精卵细胞的融合，将使染色体数倍增下去，细胞的体积也就不断地膨胀，细胞将不能适应环境而遭淘汰。减数分裂保证了生殖细胞在细胞周期中染色体的单倍化，然后通过受精作用还原为二倍体。没有减数分裂，有性生殖将是不可能的。

减数分裂保证了有性生殖生物在世代交替中染色体数目的恒定，生成配子时先减半成单

倍体（n），合子形成时，又恢复为二倍体（$2n$）。

减数分裂也是遗传变异产生的主要原因。在生物进化过程中，如果没有遗传变异，生物就不能适应环境的变化，就会失去长期生存的能力。在减数分裂过程中，有两种方式发生遗传重组。一种是通过亲代染色体在单倍体细胞中的自由组合，产生的配子所含的染色体在组成上既有祖父的也有祖母的。第二种方式是同源染色体配对时发生的 DNA 交换。这种遗传重组过程产生的单个染色体中既有父本的也有母本的基因，既有基因间的重组，也有基因内的重组。减数分裂就是通过这样两种机制产生遗传上独特的四个单倍体细胞，每个细胞都含有新重组的遗传信息。

提　要

生长和生殖是生物的基本特性，通常将通过细胞分裂产生的新细胞的生长开始到下一次细胞分裂形成子细胞结束为止所经历的过程称为细胞周期。在这一过程中，细胞的遗传物质复制并均等地分配给两个子细胞。

将细胞周期分为两个主要的阶段：分裂期（M 期）和分裂间期。M 期所持续的时间较短，一般为 30～60min，分裂间期的时间较长，根据细胞的类型和所处的条件不同而不同，有几小时、几天、几周或更长。

根据新细胞从开始生长到分裂前止的分裂间隔期中的生理和生化变化，可将分裂间期分为：G_1 期、S 期、G_2 期。

细胞周期的调控机制最早是从酵母中获得突破，发现了细胞周期蛋白和周期蛋白依赖性蛋白激酶，它们控制着细胞周期的进程。细胞周期中有两个主要的关卡，一个在 G_1 期，另一个在 G_2 期。

有丝分裂是细胞周期的分裂期（M 期）进行的分裂活动。在这个时期，通过纺锤体的形成和运动，将在 S 期已经复制好了的 DNA 平均分配到两个子细胞，以保证遗传的连续性和稳定性。这一时期的主要特征是出现纺锤体。有丝分裂包括核分裂和胞质分裂两个过程，一般在核分裂之后随之发生胞质分裂。M 期持续的时间很短，但形态变化很大，根据形态变化的特征，通常将分裂期分为前期、早中期、中期、后期和末期。

减数分裂是生殖细胞产生配子的分裂，包括两次连续的分裂，形成 4 个单倍体的子细胞。相继的两次分裂分别称为减数分裂 I 和减数分裂 II。由于细胞核分裂了两次，而染色体只是在第一次减数分裂前的间期复制了一次，所以细胞经过减数分裂导致染色体数目减少一半。

第一次减数分裂可分为前期 I，中期 I，后期 I，末期 I。第二次减数分裂可分为前期 II，中期 II，后期 II，末期 II。减数分裂是遗传重组产生的主要原因，重组的两个事件分别发生在前期 I 和中期 I。

13　胚胎发育与细胞分化

对于多细胞真核生物来说，每个个体都是由多种类型细胞构成的，如人的细胞就达200多种。虽然不同类型细胞的形态和功能各异，但它们都是由同一个受精卵产生的细胞后代分化增殖而来，即卵细胞在受精后迅速进入反复的有丝分裂（卵裂），生成后代细胞，这些细胞将循不同的发育方向，按一定规律变化，包括生长、增殖和凋亡，并组成机体的各种组织和器官。

从受精卵形成胚胎，再由胚胎生长发育成个体的过程称为个体发育（individual development）。从生长、发育、成熟到形成下一代的卵细胞或精细胞，直至个体逐渐衰老死亡的过程，构成个体发育史。从形态上看，个体发育过程经历生长（growth）、分化（differentiation）和形态发生（morphogenesis）。在个体发育中，细胞的后代在形态、结构和功能上发生差异的过程称为细胞分化，其本质是基因选择性表达的结果，即基因表达调控的结果（图13-1）。

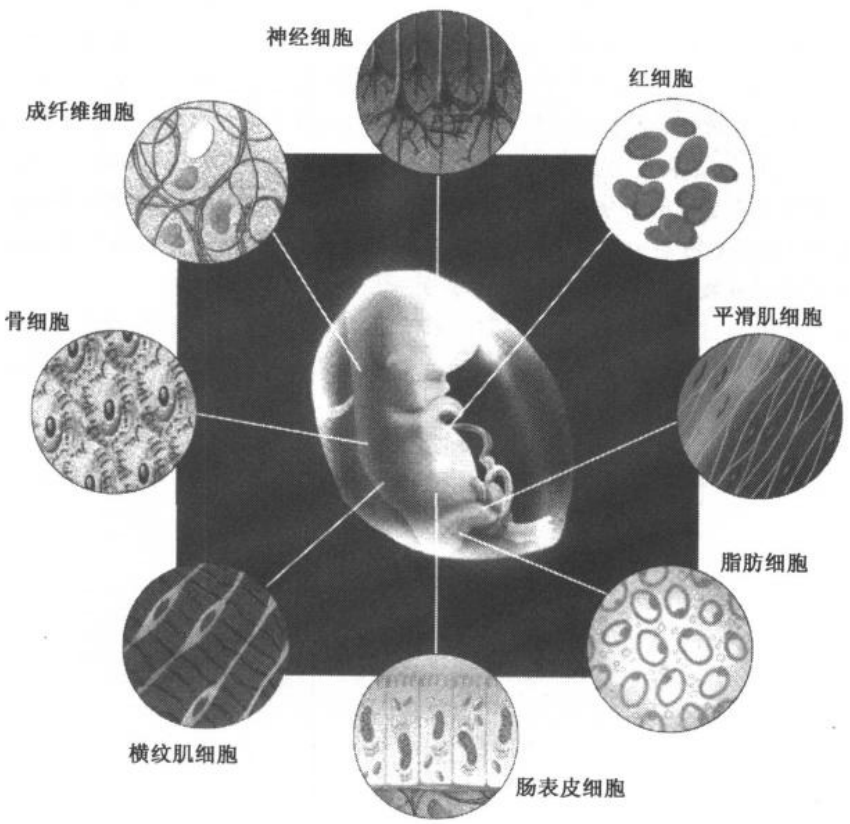


图13-1　人体不同组织分化的细胞形态（引自 Karp，1996）

13.1 配子发生与受精作用

进行有性生殖的生物，通过单倍体的雌、雄配子的融合创造下一代。配子的发生和受精是所有生物事件中最具神秘性的事件：一个受精卵通过一系列复杂的分裂、分化和相互作用，精确地产生功能各异的细胞类型，并特异地组成各种组织。

13.1.1 配子发生

配子分为雄配子（male gamete）和雌配子（female gamete），动物和植物的雌配子通常称为卵（ova 或 egg），而将雄配子称为精子（sperm）。精子相当小，并且能够运动；而卵细胞体积相当大，并且是不可游动的，如海胆的卵细胞是精细胞的 10 000 倍。尽管雌雄配子的体积不同，但它们为子代提供的核 DNA 是等量的，即各提供一套基因组。不过，由于卵细胞的体积大，子代细胞的细胞质结构和细胞质 DNA 都是由卵细胞提供的。

配子形成的过程称为配子发生（gametogenesis）。在配子发生过程中，二倍体的原始生殖细胞（primordial germ cell）要通过减数分裂和分化才能转化成单倍体的卵或精子（图 13-2）。

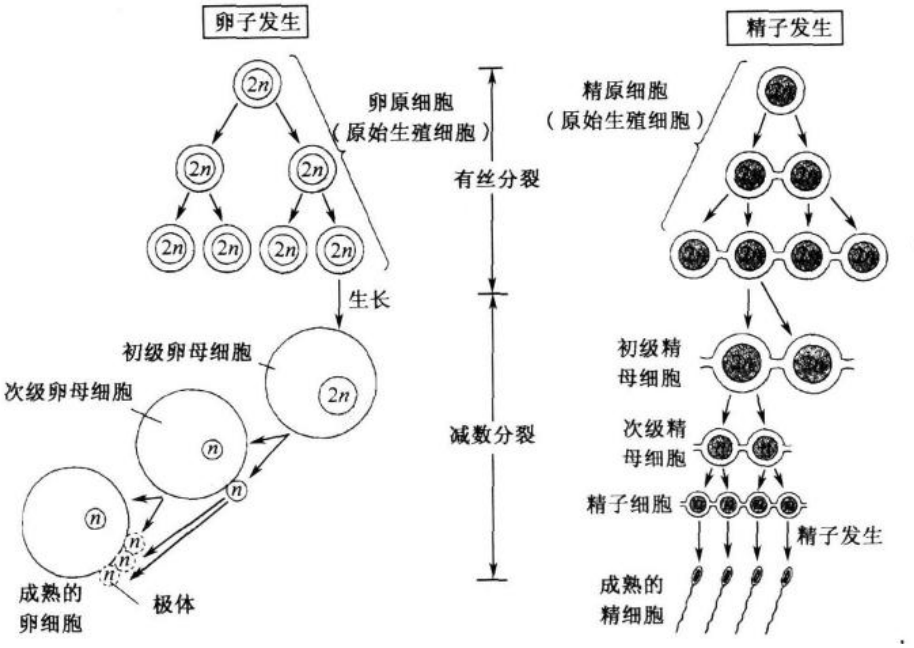


图 13-2 雌、雄配子发生过程的比较（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

雌雄配子的发生都要经过 3 个时期，即增殖期、生长期和减数分裂期。一个初级精母细胞经过两次成熟分裂形成 4 个精细胞，后者经过进一步的分化才能形成能够运动的精子；而一个初级卵母细胞只能产生一个成熟的卵子和 3 个极体。

13.1.1.1 卵子发生

在大多数动物中，卵子发生（oogenesis）（即卵子形成），发生在卵巢，并且有一个增殖

期（proliferation phase）。在该期，卵原细胞（oogonia）通过有丝分裂增加细胞数量。在人类，卵原细胞的增殖期直到胚胎发育结束才完成，因此，女性生殖周期中能够分化成卵的所有胚原基细胞在诞生时就已形成。其他生物，如两栖类和鸟类，在成年后的大部分时期都可以继续通过有丝分裂产生新的卵原细胞。

经过有丝分裂增殖之后，卵原细胞进行减数分裂，此时的卵原细胞被称为卵母细胞（oocyte）；经减数分裂，染色体发生遗传重组，并将染色体组的数量减半成为单倍体。在非哺乳类的卵母细胞中，减数分裂过程还涉及细胞体积的显著增大。为了保证卵子发生具有足够的生长期，减数分裂前期 I 的粗线期或双线期被延长；延长的时间幅度，不同的物种，变化很大，从几天到几年不等。生长期的延长，主要是让发育中的卵母细胞生长到足够的体积大小，以便能够携带足够的营养物质为胚胎发育之用。但是，哺乳动物的卵母细胞在卵子发生中生长得相对较小，这是因为哺乳动物的受精卵在雌性动物的体内发育，因此不需要储备太多的营养物质。

在卵子发生的生长期，卵母细胞常常要储备大量的蛋白质、脂类、糖类，以供受精后的胚胎发育之用。这些物质中有一些是卵母细胞自身制备的，但大多数都是靠其他来源提供的。如在两栖类和鸟类，卵要提供胚胎早期发育所需的全部营养。肝为发育中的卵母细胞提供营养起关键作用。肝为卵母细胞制造了大量的卵黄生成素（vitellogenin），这是一种连接有卵黄高磷蛋白（phosvitin）和卵黄脂磷蛋白（lipovitellin）大分子复合物。卵黄生成素由肝组织合成并分泌到血液中，然后通过卵黄生成素受体介导的内吞作用进入生长中的卵母细胞。含有卵黄生成素的内吞泡在卵黄生成素卵母细胞中逐渐积累，并最终相互融合形成大的含有营养物的卵黄小体（yolk platelet）。卵黄是含有多种蛋白、脂类、糖类的复合体。卵黄小体除了储备营养物外，也含有可被受精作用激活的水解酶类，可将卵黄水解成化学构件，用于胚胎发育。

肝细胞不是惟一为发育中的卵母细胞提供营养储备的细胞，滤泡细胞（follicular cell）为卵母细胞提供其他的物质，滤泡细胞是卵母细胞周围的细胞（图 13-3）。滤母细胞和滤泡细胞的表面都有大量的微绒毛，这样可大大增加这两种类型细胞相互接触的表面积，促进了滤泡

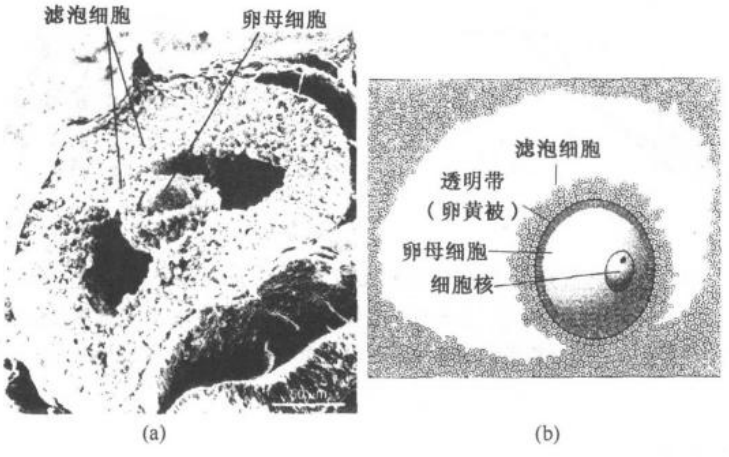


图 13-3　滤泡细胞与卵母细胞的关系（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

(a) 大鼠卵巢的扫描隧道电镜照片；(b) 典型哺乳动物卵母细胞和它周围的滤泡细胞的关系示意图。

细胞的营养物质向卵母细胞的运输。滤泡细胞不仅为以卵黄小体储备营养的卵母细胞提供营养，同时也为哺乳动物的卵母细胞直接提供营养。由于哺乳动物的胚胎可直接从母体的血液中获取营养，因此卵母细胞不必以卵黄小体储备大量的营养物；但是血液中的大多数营养还是由滤泡细胞提供的。

另一种类型的细胞，称为抚育细胞（nurse cell），为无脊椎动物，如昆虫的卵母细胞生长提供支持。抚育细胞与卵母细胞是由相同的细胞系产生的，如果蝇，一个卵原细胞的 4 次有丝分裂产生一个卵母细胞和 15 个抚育细胞。抚育细胞通过细胞质桥与发育中的卵母细胞相连，并向卵母细胞提供营养。

并非所有的卵母细胞都依赖于其他类型的细胞为自己制造储备物，在某些两栖类、鸟类和无脊椎动物中，由卵母细胞自身的糙面内质网制造卵黄蛋白，通过高尔基体后运送到卵黄小体。除了卵黄小体，高尔基体也参与卵母细胞中膜包被的色素颗粒和皮质颗粒（cortical granule）的形成，这些膜结合颗粒位于细胞的外周，形成卵母细胞的皮质。皮质颗粒含有蛋白酶，这些酶在受精的早期具有重要作用。

卵母细胞在发育过程中具有显著的不对称性（图 13-4）。卵母细胞的一端称为植物极（vegetal pole），具有大量的卵黄小体和储备营养。相反的一端称为动物极（animal pole），含有较少的储备营养，但含有细胞核、核糖体、内质网、线粒体和色素颗粒。一些特定类型的 mRNA 位于细胞质的特定区域。通过对细胞骨架功能的抑制研究发现，微管与特异 mRNA 的运输定位有关，而肌动蛋白纤维维持卵母细胞的不对称性。

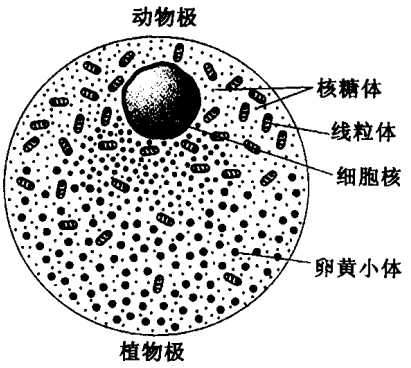


图 13-4　两栖类卵母细胞的不对称性
（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

当卵母细胞逐渐增大、细胞质成分逐渐不对称分布时，细胞表面结构也随之发生变化：非哺乳动物卵母细胞表面形成卵黄被（vitelline envelope），一种由多糖物质组成的包被；而哺乳动物的卵母细胞表面会形成透明带（zona pellucida），这种表面结构保护卵母细胞免受化学与物理因素的损伤。

卵子发生的生长期完成之后，卵母细胞准备进行减数分裂，但是卵母细胞不会自动进入成熟期，而是停滞在前期 I，直到有适当的激素进行刺激。在哺乳动物细胞中，由固醇类激素黄体酮触发进一步分裂，它激活 MPF，由 MPF 促使卵母细胞由减数分裂前期 I 进入中期 I。卵母细胞的减数分裂是高度不对称的，最后产生一个成熟的卵细胞和 3 个极体（polar body）。实际上，由卵母细胞通过减数分裂产生的成熟的卵细胞是高度分化的细胞，它们专门用于制造新的个体，它携带有用于早期发育的各种信息。

13.1.1.2　精子发生

雄性的精子发生（spermatogenesis）与卵子发生过程有很大的不同。动物的雄配子称作精子，是在睾丸中通过精子发生过程产生的。在哺乳动物中，精子发生与支持细胞（sertoli cell）的发生密切相关，支持细胞为发育中的精子提供保护和营养。实际上，精子发育的各个阶段都是发生在支持细胞的表面（图 13-5）。精子发生开始于雄性原始生殖细胞——精原细胞

(spermatogonium) 的有丝分裂，雄性中的精原细胞有丝分裂在成年后的生命过程中是持续发生的，因而能够不断产生大量的精细胞。

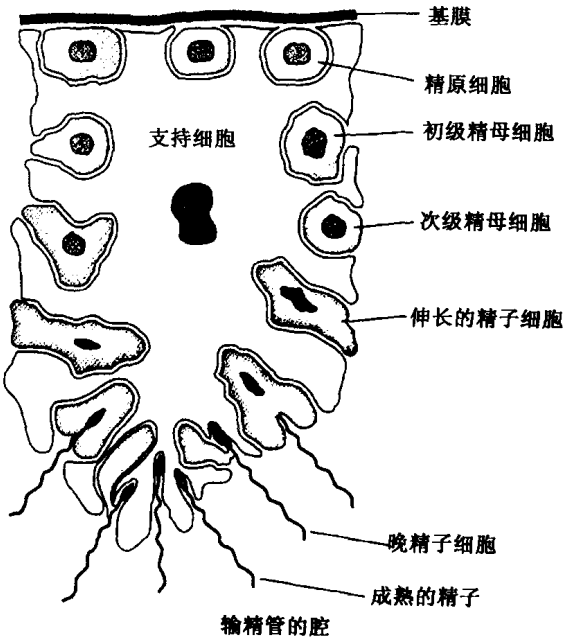


图 13-5　哺乳动物睾丸中发育的精细胞与支持细胞的关系（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

支持细胞排列在构成睾丸输精管上，包埋在支持细胞表面凹处的是发育中的精细胞。成熟的精细胞从支持细胞释放进入输精管的腔。

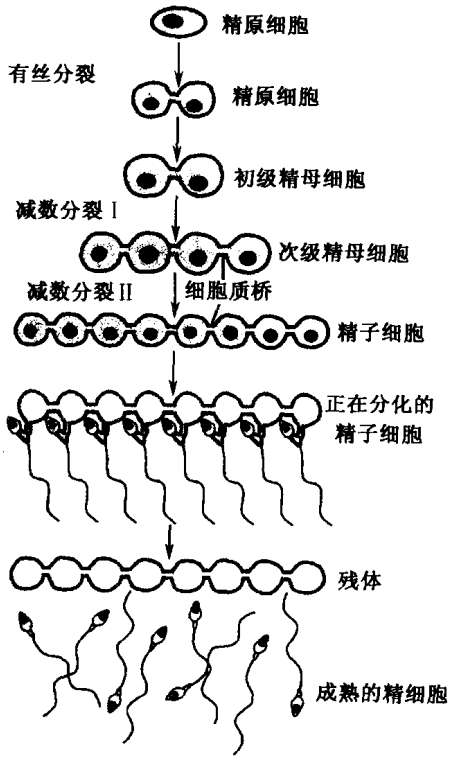


图 13-6　发育中的精子与细胞质桥（引自 Alberts *et al*., 1998）

在精母细胞 (spermatocyte) 有丝分裂增殖过程中产生的某些细胞最终分化成初级精母细胞，然后进入减数分裂。第一次减数分裂将初级精母细胞转化成次级精母细胞，经过第二次减数分裂，次级精母细胞产生成熟的精子细胞 (spermatid)。与卵子发生不同的是，精子发生没有明显的生长和形态变化；但是，在精子发生过程的有丝分裂和减数分裂过程中都使用了一种特殊的胞质分裂方式，致使胞质分裂不完全，使得形成的细胞通过细胞质桥相互连在一起（图 13-6）。雌性的配子发生中，通过减数分裂产生的卵细胞在功能上成熟的，但是在雄配子发生中，通过减数分裂产生的精子细胞在功能上是不成熟的，必须通过精子发生将减数分裂产生的精子细胞转化成成熟的精细胞 (sperm cell)，在此过程中，精子细胞要丢失大多数细胞质，并进一步分化成头尾两种结构。

在精子发生的初始阶段，精子细胞的染色质要进行紧密压缩和包装，形成高度有序而又致密的包装形式，经这种包装的 DNA 在化学性质上是惰性的，既不能用作合成 DNA 的模板，又不能作为 RNA 的合成模板。将 DNA 包装成这种惰性形式至少有两方面的作用：可以保护基因免遭化学或物理因素的损伤；其二是减小核的体积，创造最小的精细胞，以便降低能量消耗。

压缩包装的细胞核最终定位到细胞一端，形成精细胞的头。在头的顶端有一个特化的小泡，叫做顶体（acrosome），它是由高尔基体小泡发育而来。顶体含有各种水解酶类，包括酸性磷酸酶、蛋白水解酶、透明质酸酶等，由此可见，顶体是一种特化的溶酶体。

大多数物种的精细胞都有一个长长的尾，它是在一个中心粒控制下装配而成的。精子细胞通常含有两个中心粒：一个是近端中心粒，靠近细胞核，另一个是远端中心粒，在精子发生过程中，远端中心粒起始尾丝的装配。构成尾丝的微管是典型的 9+2 的排列方式。

13.1.2 受精作用

动物的配子发生产生了两种类型的单倍体细胞：精子和卵子，精子与卵子的融合，即受精作用（fertillization），重新形成一个二倍体的细胞，即受精卵。在哺乳动物、鸟类、爬行动物，受精作用发生在雌性动物的生殖系统内；而在两栖类、鱼类、无脊椎动物，受精作用发生在体外。无论是何种情况，受精作用都具基本相同的过程：精卵间的接触、精子对卵被的穿透、精子与卵子质膜的融合、卵的激活；涉及的反应包括：顶体反应（acrosomal reaction）、皮层反应（cortical reaction）、原核融合（pronuclei fussion）等。

13.1.2.1 顶体反应

大多数的精子都是靠游动来发现卵细胞，并与透明带结合。为了确保精细胞与卵子的正确结合，需要有一种特别的机制。如海胆的卵细胞外被中含有一种小肽，叫做呼吸活化肽（resact），又叫海胆卵肽，它可以作为化学附着物，扩散到海水中，能够选择性地与同种海胆精子表面的特异受体结合，这种受体具有鸟苷酸环化酶的作用，与海胆的呼吸活化肽结合之后，能够在细胞内产生第二信使 cGMP。呼吸活化肽与受体的结合，指导了精子的运动，发现卵子并与之结合。图 13-7 是海胆受精的一般过程。

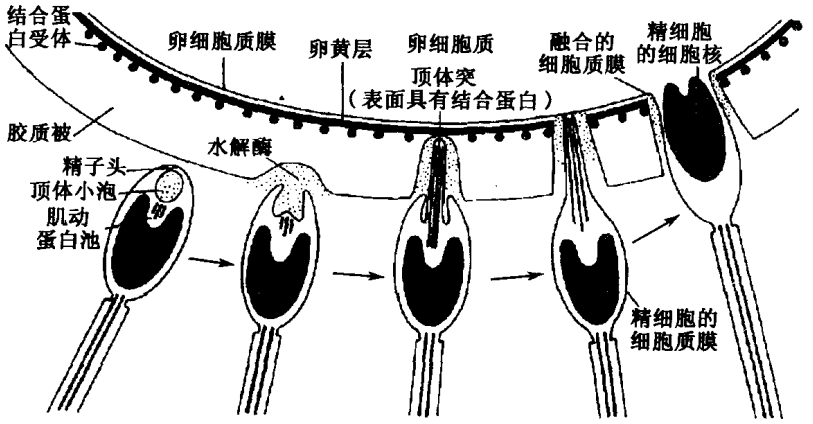


图 13-7 海胆的受精过程（引自 Campbell，1991）

当海胆的精子与卵细胞接触之后，卵细胞胶质中的一种硫酸多糖与精子细胞质膜中的受体结合，这种结合打开了精子细胞质膜中 Ca^{2+} 通道，使 Ca^{2} 扩散进入精细胞；同时，多糖与

受体的结合激活了质膜中 $Na^+ - H^+$ 交换泵，将精子细胞中的 H^+ 泵到细胞外，这样使精子细胞中的 pH 升高。由于精子细胞中 Ca^{2+} 浓度、pH 的升高激发了顶体反应：首先钙离子引起顶体膜与精细胞质膜融合，使顶体中的水解酶释放到细胞外将卵细胞的外被进行水解。在一些海洋无脊椎动物中，释放的顶体酶很快沿着新形成的顶体突（acrosomal process）流向卵细胞质膜。顶体突是从精细胞的头部前沿形成的，是肌动蛋白分子聚合作用的结果。精细胞的细胞核和顶体之间储有大量的未聚合的肌动蛋白单体，当细胞内的 pH 升高时，引起那些为防止肌动蛋白聚合而与肌动蛋白单体结合在一起的蛋白质与肌动蛋白脱离，从而促进了肌动蛋白纤维的装配，形成顶体突。

顶体突快速延伸到达卵细胞的外被，并与卵细胞透明带的外层接触。此时，位于顶体突表面的一种蛋白，叫做结合蛋白（bindin）与位于透明带表面的特异受体结合，精子的结合蛋白与卵细胞透明带的受体相互作用是高度特异性的，这种特异性保证了海胆受精作用的正确性。

在哺乳动物中，受精作用发生在雌性动物的体内，是靠精子沿生殖道游动找到卵细胞，然后发生顶体反应（图 13-8）。

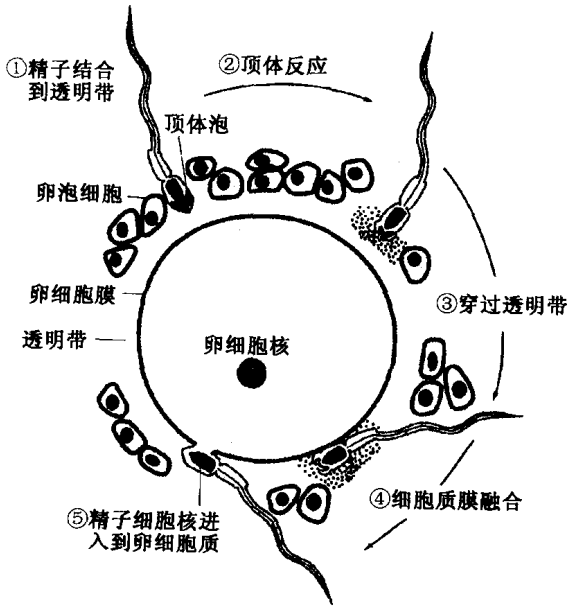


图 13-8　哺乳动物受精作用的顶体反应（引自 Alberts *et al.*, 1998）
在小鼠卵细胞的透明带中有一种单体糖蛋白，ZP3 在受精过程中负责与精子结合并诱导顶体反应。

哺乳动物在交配中射出的精子必须在雌性生殖道中被分泌物修饰，这一过程称为获能（capacitation），在人类通常需要 5～6h。精子获能是对精子细胞质膜的脂和糖蛋白成分进行修饰，其结果增强了精子的代谢能力和运动能力。一旦获能的精细胞穿透卵泡细胞层，就会与透明带结合。哺乳动物卵细胞的透明带有 3 种糖蛋白，其中 ZP2 和 ZP3 装配成纤维，而 ZP1 对这些纤维进行交联形成三维结构。ZP3 作为精子的受体，使得精子与卵细胞进行特异性的结合，引起顶体反应。

13.1.2.2 皮层反应

虽然在受精作用的开始，一个卵细胞常常被成百上千个精细胞结合（图 13-9），但在正常情况下只有一个精子能够同卵细胞的质膜融合，并将细胞核和一些细胞器注入到卵细胞质中。如果有多个精子与同一个卵细胞融合，则称为多精受精（polyspermy），一般不会正常发育。

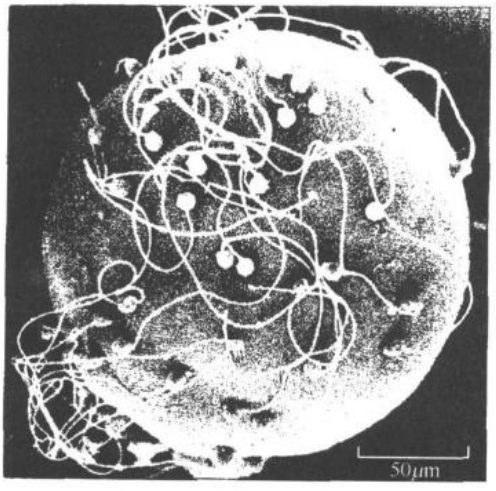


图 13-9 表面结合有多个精细胞的蛤卵细胞的扫描电镜照片（引自 Alberts *et al*., 1998）

有两种机制保证了只有一个精子与卵细胞融合：一种机制是卵细胞质膜的快速去极化，这是由第一个精子与卵细胞融合引起的，这样可快速阻止其他精子与卵细胞的融合，这一反应称为多精受精的一级阻断。Jaffe 通过实验证明，多精受精作用的阻断是由卵细胞的膜电位的改变引起的。他发现海胆卵细胞在受精后的几秒钟之内，膜电位由 −60V 上升到 +20V，质膜的去极化是由于 Na^+ 的暂时流入引起的。

由于膜电位在受精后很快恢复正常，所以要有另一种机制，即多精受精的二级阻断来保证只有一个精子与卵细胞融合，这就是卵细胞的皮层反应。当精细胞与卵细胞的细胞质膜融合时，激活了卵细胞的磷脂酰肌醇信号转导途径，引起卵细胞局部胞质溶胶中 Ca^{2+} 浓度的升高，激活了卵细胞；定位于卵细胞质外周的皮质颗粒与卵细胞质膜融合释放内含物（酶类）；释放的酶类快速分布到整个卵细胞的表面，改变透明带的结构，使之变得“坚硬”，这样，精子就不能与卵细胞结合，从而提供了一种缓慢的二级多精受精的阻断作用。从机制上说，皮质颗粒释放的酶类破坏了卵细胞透明带中与精细胞结合的受体。

13.1.2.3 原核融合

精细胞穿过卵细胞的透明带后，精细胞的质膜与卵细胞的质膜相互接触，然后在融合蛋白的帮助下进行两细胞质膜的融合，这样在精卵细胞间形成一个连续的细胞质区，为精细胞的细胞核进入卵细胞创造了一条通路。精细胞的细胞核进入卵细胞质后，包装紧密的染色质开始解旋。精子的细胞核膜解体形成小的囊泡，并立即与精子细胞核脱离，形成没有核被膜的精子染色质，但很快形成新的核被膜，此时称为雄性原核（male pronucleus）。雄性原核向卵细胞的雌性原核移动，这种迁移是由精细胞的中心粒产生的微管指导的，精细胞的中心粒是随细胞核一同进入卵细胞的。当两个原核相互接触时，通常会发生融合，形成一个二倍体的核（图 13-10）。

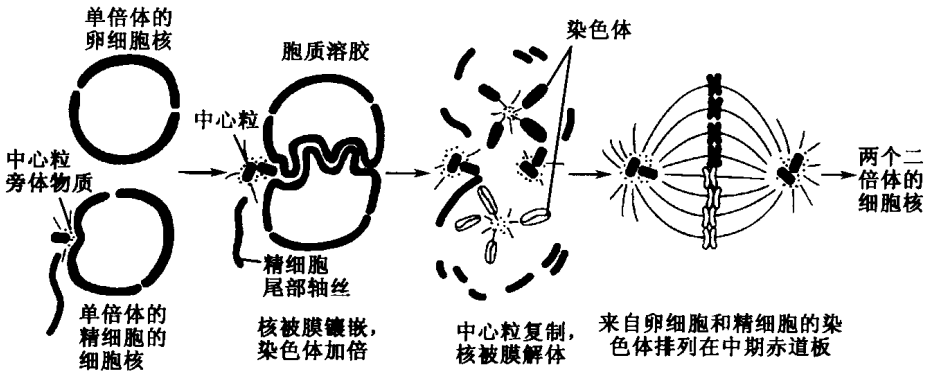


图 13-10　哺乳动物受精后的精细胞与卵细胞的两个原核的融合（引自 Alberts *et al*., 1998）
原核移到卵细胞的中央，当它们碰到一起时，各自的核被膜解体，中心粒复制，两个配子的染色体在纺锤体的作用下排列在同一个赤道板，进行合子的第一次卵裂。

13.1.2.4　受精激活与母体效应

在原核的融合和卵裂中需要受精卵进行蛋白质的合成和 DNA 的复制。其实，在精细胞与卵细胞的质膜融合后的几分钟之内就已开始了蛋白质的合成和 DNA 的复制，这是受精激活的结果。如海胆的卵母细胞，在受精前，只有不到 1%的核糖体具有活性，所以蛋白质合成几乎完全停滞。但受精后不到 5min，蛋白质合成速率大大增加，不到 30min，蛋白质合成速率达到最高（图 13-11）。此时加入 RNA 合成的抑制剂不会影响蛋白质合成，这表明合成蛋白质的 mRNA 是卵母细胞带来的，并且是以非活性状态存在，只有受精后才被激活，这些由卵母细胞带来的信息分子称为母体信息（maternal information）。据分析，许多动物的卵母细胞中含有 2～5 万种不同核苷酸顺序的 mRNA，每种有 600 个拷贝之多。关于受精后蛋白质合成被激活的机制，有几种推测：①卵母细胞中的 mRNA 是以 RNP 颗粒形式存在的，有结合蛋白保护，受精后，这些保护 mRNA的蛋白质被去除；②在卵母细胞中的 mRNA 5′端没有帽子结构，受精后进行了 5′端的修饰被激活；③一些参与蛋白质合成的起始因子被激活。

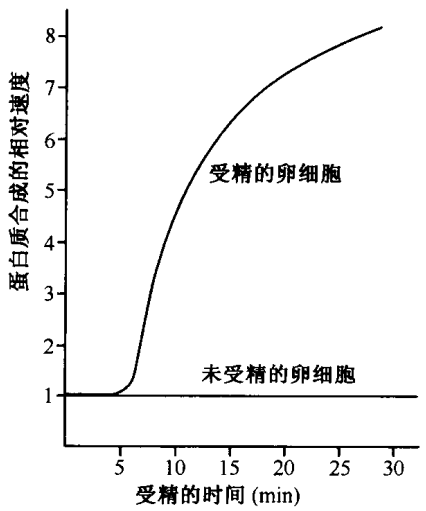


图 13-11　海胆卵细胞受精后蛋白质合成的激活（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

激活蛋白质的合成和 DNA 的复制是由于受精卵中的 pH 升高所致：未受精的海胆卵细胞中的 pH 为 6.8，这种 pH 值抑制了细胞内的代谢活性，如果将未受精的卵细胞与胺接触，蛋白质的合成和 DNA 的复制作用都被激活。由于蛋白质的合成和 DNA 复制的激活与细胞内 Ca^{2+} 浓度的升高、皮层反应都无关，说明 pH 的升高对蛋白质合成和 DNA 复制的激活机制与其他受精激活机制是不同的。后来的研究证明精细胞与卵细胞质膜的融合，能够激活蛋白激

酶 C，再由蛋白激酶 C 将激 $Na^+ - H^+$ 交换泵激活，Na^+ 暂时进入受精卵的细胞质中，提高了细胞质中的 pH，激活了蛋白质的合成。

实际上，精细胞与卵细胞的结合，激活了卵母细胞质膜中的磷脂酶 C，它产生了两种第二信使：IP_3 和 DAG。DAG 激活蛋白激酶 C，最终导致蛋白质的合成和 DNA 复制的激活。而生成的 IP_3 可引起皮层反应，并促进受精卵完成减数分裂。图 13-12 总结了海胆受精作用引起的反应。

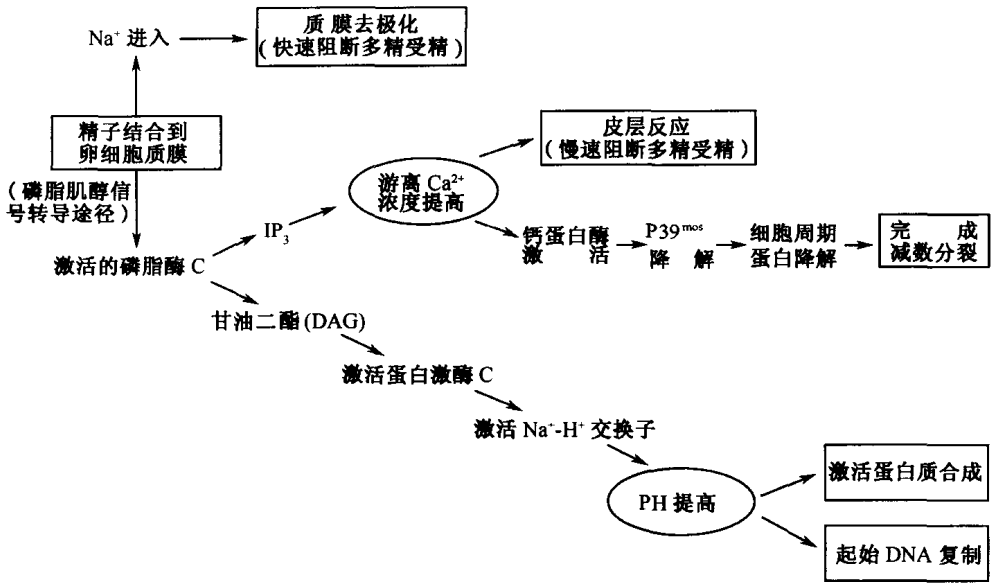


图 13-12　海胆卵细胞受精激活反应（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

精细胞与卵细胞的融合，激发了卵细胞质膜的两种反应，一是 Na^+ 的通透性增加，引起质膜的去极化（快速阻断多精受精）；二是激活磷脂酰肌醇信号转导途径，产生两种第二信使：IP_3 引起细胞内 Ca^{2+} 浓度升高，触发皮层反应（慢速阻断多精受精），并促进减数分裂完成；DAG 引起细胞内 pH 的升高，激活蛋白质的合成和 DNA 复制图中 $P39^{mos}$ 是一种抑制细胞周期蛋白降解的蛋白激酶。

13.2　胚胎形成与分化

受精发生之后，受精卵要进行一系列的分裂、分化和相互作用，最后发育成一个新的个体。

13.2.1　胚胎形成

人和哺乳动物胚胎发育经历大致相同的分化发育过程。受精后胚胎的早期发育主要包括卵裂、胚泡形成和宫内植入 3 个阶段。

13.2.1.1　卵裂

根据生物的不同，卵细胞的受精作用可以发生在成熟的任何阶段（如初级卵母细胞、中

期 I、次级卵母细胞、中期 II，或减数分裂结束)；如果卵细胞还没有完全成熟就进行受精，则受精作用激发完成减数分裂。减数分裂完成之后，受精卵进入快速的有丝分裂，称为卵裂(cleavage)，卵裂时细胞不会生长。经过卵裂，受精卵被分割成很多小细胞，这些由小细胞组成的中空球形体称为囊胚（blastula)。

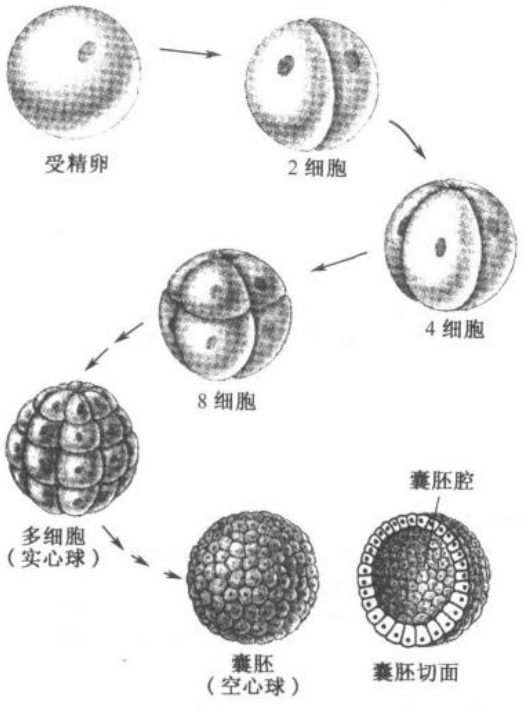


图 13-13　受精卵的卵裂（引自 Becker *et al*., 1996)

受精卵的卵裂中的有丝分裂与体细胞有丝分裂比较具有以下 3 个特点：①细胞增殖，伴随着一定程度的卵内物质的重新分配，但无细胞生长；②由于第一个特点而产生的核质比例越来越大；③细胞间期较短，分裂快，迅速形成囊胚（图 13-13)。

受精卵的卵裂速度比成年细胞的分裂快得多，如一个受精的蛙卵在不到两天的时间内可分裂成 37 000 个细胞，非洲爪蟾卵裂 6h 达到 10 000 个细胞组成的囊胚，细胞体积越来越小。卵裂之所以快，是因为省去了 G_1 期，此期主要是用于细胞的生长。由于卵裂过程不需要等细胞长大，所以卵裂时细胞周期极短，几乎只有 S 期和 M 期，但随着卵裂的持续，G_1 期开始恢复，到卵裂结束时，G_1 期重新出现。

对于大多数动物的受精卵来说，RNA 合成抑制剂并不能抑制卵裂，说明卵裂过程中的代谢主要是利用卵细胞储备的 mRNA。这个时期，DNA 合成旺盛，组蛋白合成相匹配，不过组蛋白的 mRNA、纺锤体微管蛋白 mRNA 等都是由卵细胞带来的。

另外，由于卵细胞的细胞质是不对称分布的，卵裂所产生的小细胞获得的细胞质物质是不同的，这对其卵裂细胞的分化发展方向具有重要作用。

13.2.1.2　原肠胚形成

卵裂结束，囊胚细胞要经过一系列复杂的运动，这导致细胞空间相互关系的改变。虽然不同生物的囊胚细胞的运动过程的变化极大，但是脊椎动物都有一个共同的特点：在囊胚的表面形成一个开口，叫胚孔（blastopore)，细胞通过胚孔移入到囊胚的内层。囊胚细胞迁移，最终将囊胚转变成原肠胚（gastrula)，它是由 3 层细胞层构成的（图 13-14)：外胚层（ectoderm)、中胚层（mesoderm)、内胚层（endoderm)。外胚层和内胚层最终形成组织的鞘，即上皮（epithelia)，覆盖在器官的外表面和内表面。外胚层形成覆盖在外表面的上皮（皮肤和腺体）以及中性组织；内胚层分化成的上皮覆盖在组织的内表面（胃肠和相关的腺体)；中胚层最终发育成扩散的海绵网状间充质细胞（mesenchyme cell)，这些细胞形成支持细胞，如肌肉、软骨、骨、血和结缔组织。

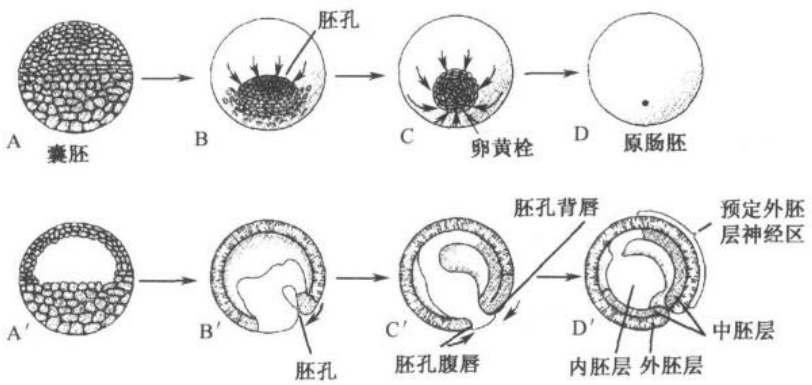


图 13-14　原肠胚形成（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

A～D：原肠胚形成的立体示意图；A′～D′：原肠胚形成切面示意图。

在原肠胚中形成的新的细胞关系，激发了细胞-细胞相互作用、代谢的变化、细胞的移动，最终形成组织和器官。

13.2.2　细胞分化、细胞决定与形态发生

细胞分化是胚胎细胞分裂后，未定形的细胞在形态和生化组成上向专一性或特异性方向发展，或由原来较简单具有可塑性的状态向异样化稳定状态发展的过程。也就是说细胞分化是指同一来源的细胞逐渐发生各自特有的形态结构、生理功能和生化特征的过程。细胞分化时的主要特征是细胞出现不同的形态结构和合成组织特异性蛋白质，演变成特定表型的细胞类型。其结果是在空间上，细胞之间出现差异；在时间上同一细胞和它以前的状态有所不同，从本质上说，细胞分化是从化学分化到形态、功能分化的过程。

细胞决定（cell determination）是指细胞在发生可识别的形态变化之前，就已受到约束而向特定方向分化，这时细胞内部已发生变化，确定了未来的发育命运。细胞在这种决定状态下，沿特定类型分化的能力已经稳定下来，一般不会中途改变。

多细胞个体起源于一个单细胞受精卵，从受精卵衍生出整个机体的各种组织器官。因此，就分化潜能来说，受精卵具有全能性（totipotency）。在绝大多数情况下，受精卵通过细胞分裂直到形成囊胚之前，细胞的分化方向尚未决定。从原肠胚细胞排列成三胚层之后，各胚层在分化潜能上开始出现一定的局限性，只倾向于发育为本胚层的组织器官。外胚层只能发育成神经、表皮等；中胚层只能发育成肌肉、骨等；内胚层只能发育成消化道及肺的上皮等。三胚层的分化潜能虽然进一步局限，但仍具有发育成多种表型的能力，将这种细胞称为多能细胞（pluripotent cell）。经过器官发生，各种组织的发育命运最终决定，在形态上特化，在功能上专一化（specialization）。胚胎发育过程中，这种逐渐由“全能”局限为“多能”，最后成为稳定型“单能”（unipotency）的趋向，是细胞分化的普遍规律。细胞决定可看做分化潜能逐渐限制的过程，决定先于分化。

13.2.2.1 细胞质对细胞分化的诱导

在受精卵的每一次卵裂时，细胞核内的物质，包括基因组都平均地分配到子细胞内，所以子细胞内的遗传物质是相同的。但是，卵细胞质各区域的组分并不相同。卵裂使不同的细胞质组分分割进入各卵裂细胞。从卵母细胞开始，细胞质或表面区域就是不均质的，如用肉眼就能明显地观察到蛙的卵母细胞中的动物极和植物极。这种不均质性，对胚胎的早期发育有很大影响，在一定程度上决定细胞的早期分化。从受精卵第一次卵裂开始，细胞核就受到内环境（即不同的卵细胞质）的影响。这些特殊细胞质组分称为细胞质决定子（cytoplasmic determinant）。

细胞质决定子在卵母细胞中已然形成，受精卵在数次卵裂中，决定子一次次地重新改组、分配。卵裂后，决定子的位置固定下来，并分配到不同的细胞中，影响不同细胞的分化。

软体动物极叶（polar lobe）的形成就是细胞质对分化影响的典型例子。在软体动物的卵裂球分裂时可以观察到受精卵的细胞质中的物质分布并不是完全均匀的，含有一些将分化为中胚层必需的特殊物质可能在分裂时先“偏心”地突出胞体形成极叶，在分裂时这部分胞质只进入一个子细胞，而同时核物质包括基因组倍增复制，然后均匀分布到两个子细胞中。有意思的是，分裂后这部分极叶细胞质会缩回，到下一次分裂时再重复这种不均等分裂的过程。

极叶是卵裂初期从植物极形成的一个暂时性的大的细胞质突起（图 13-15）。如果人工将极叶除去，将会发育成在足、眼和壳等有缺陷的个体。

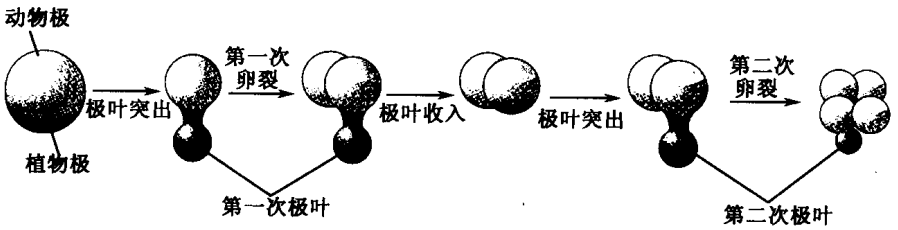


图 13-15 软体动物卵极叶的形成（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）

细胞质对性细胞的分化亦起重要作用。如双翅目昆虫的受精卵后端有一部分称为极质（pole plasm）。果蝇的卵在受精后的 2h 内只进行核分裂，细胞质不分裂，形成合胞体胚胎。随后核向卵边缘迁移，每个细胞核周围包上了细胞膜，结果在卵边缘变成了细胞胚层，共约 3 500个细胞。每一个核都具有全能性，既可分化成体细胞，又可分化成性细胞。细胞的分化命运决定于核迁入不同的细胞质区域。迁入卵后端极质中的形成极细胞，最后分化为生殖细胞。

极质中含有膜包起的颗粒状物质，称为极粒（polar granule）。当核进入极质后，极粒围绕在核周围，诱导极细胞分化为生殖细胞。

13.2.2.2 细胞的相互作用对细胞分化的诱导

多细胞生物的细胞是生活在细胞社会之中的，所以，细胞社会中各细胞群体必然要建立相互协调关系才能形成具有正常形态和生命活动协调的个体。因此，细胞的分化方向除了细

胞质具有决定作用外，相邻细胞间的相互关系也有重要影响。

动物在一定的胚胎发育时期，一部分细胞影响相邻细胞使其向一定方向分化的作用称为胚胎诱导（embryonic induction），或称为分化诱导。能对其他细胞的分化起诱导作用的细胞称为诱导者或组织者，这一现象是通过移植实验发现的。

如将正常的能够发育成神经组织的细胞从两栖类原肠期的早期胚胎中切下，然后移植到另一个胚胎的可以发育成表皮的区域中，结果，移植来的细胞发育成了表皮而不是神经细胞。同样，将可以分化发育成表皮组织的细胞移植到能够发育成神经组织的胚胎中，移植的细胞发育成了神经细胞。

但是，条件的不同对细胞分化能力的改变具有一定的限制。如果用晚原肠期（大约 2d 后）的细胞进行上述相同的实验，其结果完全不同：将神经组织的细胞放在胚胎的能够发育成表皮组织的部位将不会发育成表皮，而是神经细胞，反之亦然。为什么用早原肠期和晚原肠期的细胞做移植实验的结果如此不同？是什么因素决定移植的细胞发育成神经细胞还是表皮细胞？在原肠胚形成过程中，位于胚孔上方的细胞将内陷到胚胎的内部，产生一种多层结构，其中有些细胞直接处于将发育成神经细胞的层面下。为了在新内陷的细胞中寻找是否存在有决定神经细胞发育的细胞，Spamann 和 Mangold 用蝾螈胚胎进行了一系列移植实验：他们将一种原肠胚胚孔的动物极的细胞移植到另一个原肠胚不同位置。为了区别供体和受体，他们选择两种具有不同色素的蝾螈胚胎，一个颜色较深，一个颜色较浅。结果是移植的胚孔物质诱导宿主发育成一个全新的胚胎：一个复合双生体（siamese twins），并且新胚胎的颜色与宿主的相似（图 13-16）。

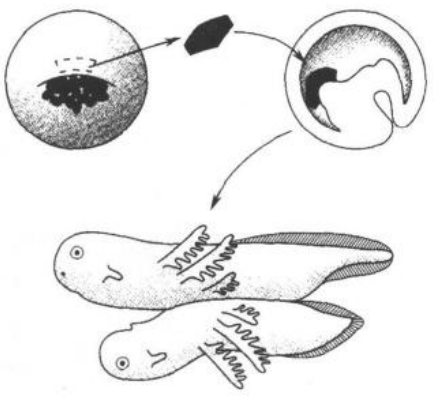


图 13-16　胚胎初级诱导作用的实验证明
（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）
将有深色素的蝾螈原肠胚胚孔背唇细胞移植到浅色素蝾螈原肠胚，出现第二个胚胎发育，如同复合双生。由于复合双生是浅色素的，那么深色素的背唇细胞必须被浅色素的宿主细胞诱导分化成第二个胚。

胚胎诱导一般发生在内胚层和中胚层或外胚层和中胚层之间。从诱导的层次上看，分为 3 级，即初级诱导、二级诱导和三级诱导。能够诱导新胚胎形成的现象称为初级胚胎诱导（primary embryonic induction）。

分化诱导现象也见于生长发育的其他阶段中，如成体动物中胚层来源的间质细胞对外胚层来源的许多组织细胞的诱导作用，这种诱导对这些细胞的维持、生长和分化是必不可少的。在 3 个胚层中，中胚层首先开始独立分化，对相邻内、外胚层细胞的分化诱导出现较早，作用较强。例如，在胚胎早期，在中胚层脊索的诱导下，外胚层的未分化细胞经过神经板、神经管、神经褶等阶段，逐渐形成脑泡的原基，然后向羊膜腔内形成头褶，以后进一步发育为前脑、中脑和菱脑，最后整个神经系统分化发育完成。如果预先去掉脊索，则神经板发育分化受阻。

细胞诱导的机制涉及细胞与细胞的接触、细胞基质的接触、信号分子的扩散等，可能是通过某些化学诱导物实现的。诱导物从诱导组织进入反应组织引发诱导。这些诱导物可能是

大分子的蛋白质或核酸类，也可能是小分子或信号分子。另外，细胞外基质在细胞诱导中可能有重要作用。

13.2.2.3 形态发生

单细胞生物仅有时间上的分化，这常是适应外界环境变化的一系列改变，主要表现为具有特殊代谢和形态的孢子形成，其中重要的是有相当大比例的原有的 mRNA 和蛋白质降解，并新合成一些酶和蛋白质；分裂方式变为减数分裂。

多细胞生物既有时间上的分化，又有空间上的分化。在个体的细胞数目大量增加的同时，分化程度越来越复杂，细胞间的差异也越来越大；而且同一个体的细胞由于所处位置不同而在细胞间出现功能分工，头与尾、背与腹、内与外等不同空间的细胞表现出明显的差别。因此，胚胎发育不仅需要将分裂产生的细胞分化成具有不同功能的特异的细胞类型，同时，要将一些细胞组成、功能和形态不同的组织和器官，最后形成一个具有表型特征的个体，这一过程称为形态发生（morphogenesis）。在形态发生的过程中，细胞间的位置关系要发生改变，同功能的细胞组成组织，其关系密切，与不同功能的组织细胞进行协调工作，共同维持个体生命。在发育过程中，为了建成合适的多细胞组织，细胞必须能够选择性地识别同类细胞并相互黏着组成组织，这在第 4 章已进行了详细的讨论。

在发育分化过程中，最令人感兴趣、同时可能也是研究难度最大的研究课题之一就是发育中的位置信息的获取及其对分化的影响。从单个受精卵开始，细胞一方面以时间为主轴有序地进行分化，形成不同类型的细胞；另一方面又严格按照形态发生所预定的整体构造蓝图进行增殖、迁移、排列以及和其他类型细胞组合，生成各种组织和器官，直至最后形成成熟的个体。在不断分裂和移动中的细胞如何感知自己的瞬间空间位置并依此决定分化方向或调整移动路径？细胞如何得知已经迁至适当位置并应该开始参与形成不同的组织和器官？

为了解决这个问题，细胞必须能够检测到自己在胚胎的哪个部位，并根据位置信息指导它们自身的分化和行为。有人提出形态发生素（morphogen）假说来解释处于胚胎不同部位的细胞在发育过程的形态发生行为：胚胎发生素在胚胎的特定部位合成和分泌，然后扩散到周围组织，形成一种浓度递减的梯度。细胞通过适当的受体“感知”自身部位的形态发生素的浓度，细胞就可以估测自己离形态发生素产生源有多远。

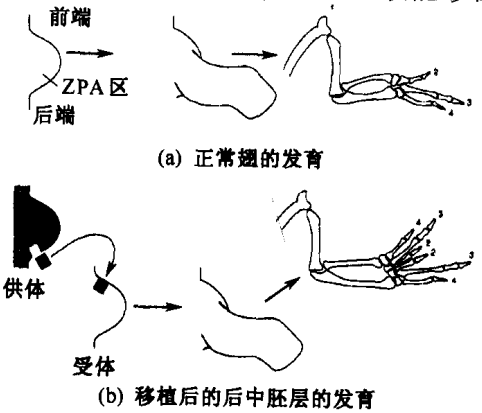


图 13-17 在鸡胚翅形成过程中后中胚层位置信息的作用（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）
(a) 在正常的发育过程中，鸡翅形成 3 个趾，编号为 2，3，4，它们对应于 5 指中 3 个；(b) 如果将 ZPA（极性激活区）的一片后中胚层移到另一个肢芽的前侧，则会形成两个 3 趾，且互为镜像。

实际上，形态发生素假说强调的是位置信息（positional information）对形态发生的影响。科学家通过对鸡的肢芽（limb bud）发育研究，肯定了位置信息在形态发生中的作用。

鸡胚胎的腿和翅开始是由一小团中胚层发育形成肢芽，肢芽早期为舌形突起，内部为中胚层来源的间叶组织，表面覆盖着外胚层表皮。当肢芽逐渐长长时，肢芽就会发育成适当的骨组织，

并在肢芽的末端形成指。指导肢形成的位置信息是由中胚层组织的一小块区域发出的，该区域称为极性激活带（zone of polarizing activity，ZPA），它位于肢芽的后端附近。如果将此处的组织移植到另一个肢芽的前端，其结果会发育成正常个体的两倍数量的趾（图 13-17），这就是位置信息对发育的影响。

13.2.3 影响分化和形态发生的其他因素

我们讨论了决定细胞分化和形态发生中的一些主要因素，由于分化和形态建成是非常复杂的过程，影响的因素相当多。

13.2.3.1 细胞黏着分子在胚胎发育中的作用

研究表明细胞黏着分子在神经诱导过程中起重要的调节作用。脊椎动物神经系统的发育从神经管形成开始，随着胚胎三胚层的出现，在外胚层形成一条纵沟。这条纵沟的边缘（即神经外胚层的分解）逐渐升高并在背中线处会合。边缘连合后与外侧的外胚层分离，形成神经管。神经管被一层连续的外胚层上皮覆盖。Edelmann 等比较了两个基本的细胞黏着分子——神经细胞黏着分子（N-CAM）和肝细胞黏着分子（L-CAM）在神经管形成中的分布。他们发现神经外胚层与相邻外胚层的分离可能与这两类细胞黏着分子的表达调节有关。

13.2.3.2 激素对分化和形态发生的影响

在细胞之间的分化调节方式中，除了相邻细胞之间的作用外，还有远距离的调节作用。随着机体发育，细胞数目增加，机体体积增大，结构逐渐复杂，对远距离细胞的分化调节出现了一种新方式，即激素作用方式。

激素对细胞分化的作用出现在发育的晚期，所以激素引起的反应是按预先决定的分化程序进行的，其作用主要是引起靶细胞进行分化。例如，激素和某些细胞因子对哺乳动物性别分化的调节。在发育的早期阶段，雄性和雌性表型从外形上看还无法区别，性分化最早可见的现象发生在胚胎第 9 周，主要是合成一些特殊的细胞因子和激素。

13.2.3.3 分化抑制

分化完成的细胞可以产生抑素（chalone），这种化学介质可抑制附近的细胞进行同样的分化。例如，把一个正在发育的蛙胚放到含有一片成体蛙心组织的培养液中培养，胚胎不能发育出正常的心脏。若没有这片蛙心，胚胎就可以正常发育。这种分化抑制是发育过程中常见的负反馈调节现象，它和分化诱导共同协调作用，维持正常细胞的分化和胚胎的发育过程。

13.2.4 细胞分化中的核质关系

13.2.4.1 细胞质对细胞核的影响

许多实验表明细胞质能够影响细胞核的基因表达。鸡的红细胞是终端分化细胞，它的细

胞核染色质是高度凝聚的，不合成 RNA 或 DNA。当鸡红细胞与培养的人 HeLa 细胞（去分化的癌细胞）融合后，核的体积增大 20 倍，染色质松散，出现 RNA 和 DNA 合成，鸡红细胞核的重新激活是由于 HeLa 细胞的细胞质调节的结果。

细胞质对基因表达具有调节能力。De Robertis 和 Gurdon 将培养的爪蟾肾细胞核注入蝾螈的卵母细胞内，分析蛋白质合成情况，发现，原来在肾细胞中表达的基因，此时不表达，而原来不表达的基因，这时却被激活。说明卵母细胞质中含有某些成分，这些成分控制基因表达的开关，对某些基因能激活，而对另外一些基因则起抑制作用。

13.2.4.2 细胞核对细胞质的影响

Hämmerling 和 Brachet 用不同帽形，即伞形和菊花形“帽”的伞藻研究了核质关系。

伞藻长约 6cm，在其基部假根有一核，在顶端有一帽形结构。伞藻的帽形是由核决定的。如果将伞形帽品种的核移植到去核的菊花形帽的伞藻的细胞中，在第 2 周可出现一中间帽形，到第 3 周，帽完全变成了伞形。反过来移植，则变成菊花形帽。这些实验结果说明细胞核对细胞质的决定作用（图 13-18）。

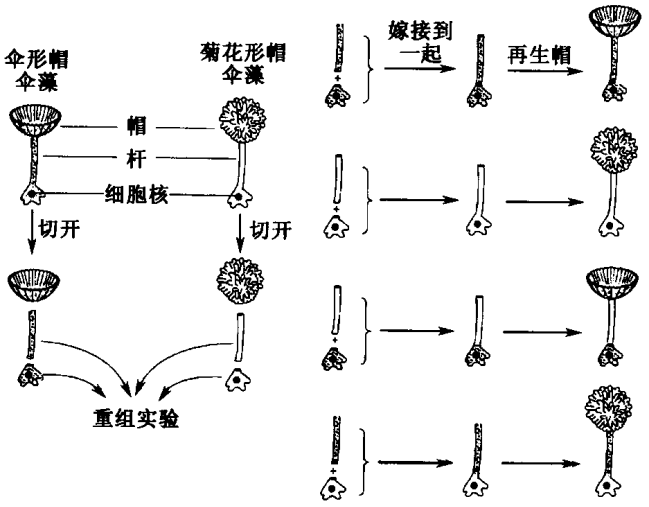


图 13-18 伞藻移植试验（引自 Kleinsmith *et al.*，1995）

有人用黑白两种肤色的蛙为材料进行核移植试验研究核质关系。黑色为显性，白色为隐性，都是由细胞核控制的。实验时，将带有显性黑色基因取自囊胚的核移植到带有隐性白色基因经紫外线照射处理的无核卵中，在移植成功长成的蛙中，全部出现了黑色的表现型。这说明蛙的色素是由细胞核控制的，并在以后的胚胎发育过程中受到影响而改变它的作用。

13.2.5 转决定、脱分化与再生

细胞分化中最显著的特点是分化状态的稳定性。特别在高等真核生物中，分化状态一旦建立，其分化状态是十分稳定的，并能遗传给许多细胞世代。如神经元可在整个生命过程中保持着分化状态。一般的细胞生理活动引起的变化，如激素所引起的变化，当刺激作用消失后，

细胞又回到原来状态。细胞分化则不同，它不会自发地逆转。但是，分化的细胞可以在特定条件的诱导下进行脱分化，这就是分化的可逆性，其根本原因是分化细胞保留着全部基因组，可以通过适当条件去分化，进行再生（图 13-19）。

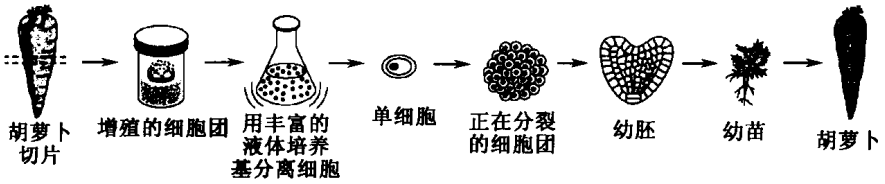


图 13-19　胡萝卜分化细胞再生成完整的植株（引自 Alberts *et al*., 1994）

13.2.5.1　转决定

一般胚胎细胞一旦决定，沿着特定类型进行分化的方向是稳定的，但在果蝇中发现了某种突变体或培养的成虫盘细胞中有时会出现不按已决定的分化类型发育，而生长出不是相应的成体结构，这种现象叫转决定（transdetermination）。转决定与基因突变不同，它是一群细胞而不是单一细胞发生变化。

转决定的细胞可以回复到决定的原初状态，但更多的是突变成其他类型的结构，如触角成虫盘细胞变成翅或腿等。

13.2.5.2　全能性

分化细胞保留着全部的核基因组，它具有生物个体生长、发育所需要的全部遗传信息，即能够表达本身基因库中的任何一种基因，也就是说分化细胞具有发育为完整个体的潜能，称为全能性（totipotency）。

对全能性的认识，首先是在植物方面取得突破。自从 1958 年 Steward 等利用胡萝卜根的韧皮部组织培养出了完整的新植株后，已经有不少这方面成功的例子，尤其是双子叶植物。

在动物方面，虽然在整体上，动物细胞的全能性随着细胞分化程度提高而逐渐受到限制，分化潜能变窄，但在细胞核方面，它含有保持物种遗传性所需的全套基因，而且并没有因细胞分化而丢失基因，因此在理论上，高度分化细胞的细胞核仍具有全能性。英国科学家利用成年绵羊的体细胞成功克隆了一只小羊，从实践上证明了高度分化的动物细胞核也具有全能性。

13.2.5.3　脱分化

脱分化（dedifferentiation）又称去分化，是指分化细胞失去特有的结构和功能变为具有未分化细胞特性的过程。在动物中，脱分化细胞具有胚胎间质细胞的功能。在植物中，脱分化细胞成为薄壁细胞，称为愈伤组织（callus）。脱分化往往随之又发生再分化（redifferentiation）。

不同生物的脱分化能力往往是不一样的，所以，在细胞工程中，通常采用人工的方法诱导脱分化，如用激素等。

13.2.5.4 再生

生物体的整体或器官受外力作用发生创伤而部分丢失，在剩余部分的基础上又生长出与丢失部分在形态与功能上相同的结构，这一修复过程称为再生（regeneration）。生物体在正常生理条件下也要不断更新某些组织或细胞，如上皮细胞的脱落和置换、血细胞的更新等，这些现象虽与再生有些相似，但在性质上有所不同，前者是由于干细胞的增殖对衰老细胞的更新，故不属再生的范畴。

再分化是再生的基础，也就是说，在再生过程中，有些细胞首先要发生脱分化，然后发生再分化，形成失去的器官或组织。

13.3 细胞分化的分子基础

前面讨论了细胞分化的一些基本规律以及影响分化的一些因素，但是细胞分化的本质是什么？人体基因组中起作用的基因总数大概为 3 万～3.5 万个，这些基因在分化的细胞中是否都表达？如果表达有差异，那么这些差异是如何表现的？这就是细胞分化的分子机制问题。

13.3.1 分化细胞的基因表达

在细胞发育过程中，细胞分化的命运受卵细胞卵裂后所获得的细胞质因子的控制，并受相邻细胞的诱导。一旦细胞发育的命运被决定，细胞如何按照决定的程序进行精确地分化？从分子水平看，分化细胞间的主要差别是合成的蛋白质种类不同，如红细胞合成血红蛋白、胰岛细胞合成胰岛素等。而蛋白质是由基因编码的，所以合成的蛋白质不同，主要是表达的基因不同。不难理解，细胞分化的分子基础在于基因表达的控制。

13.3.1.1 持家基因与奢侈基因

在胚胎发生过程中，细胞分化与基因表达存在何种具体的关系还不清楚。事实上，细胞的基因并非都是同细胞分化有直接关系。根据基因同细胞分化的关系，可以将基因分为两大类：一类是持家基因（house-keeping gene），是维持细胞最低限度功能所不可少的基因，如编码组蛋白基因、核糖体蛋白基因、线粒体蛋白基因、糖酵解酶的基因等。这类基因在所有类型的细胞中都进行表达，因为这些基因的产物对于维持细胞的基本结构和代谢功能是必不可少的。

另一类是组织特异性基因（tissue-specific gene），或称为奢侈基因（luxury gene）。这类基因与各类细胞的特殊性有直接的关系，是在各种组织中进行不同的选择性表达的基因。如表皮的角蛋白基因、肌细胞的肌动蛋白基因和肌球蛋白基因、红细胞的血红蛋白基因等。

13.3.1.2 基因差异表达及调节

早在 1897 年，澳大利亚的科学家 Weismann 就推测：在细胞分化过程中，特化细胞只保留了与自身特定功能相关的遗传信息，其他的遗传信息被逐步破坏了。后来对这一推测进行

了修改，提出分化的细胞虽然保留了全套的遗传信息，但只有某些基因得到表达。现在知道细胞分化主要是组织特异性基因中某些种（或某些）特定基因的选择性表达的结果，这些选择性表达的蛋白质和分化细胞的特异性状密切相关，但不是细胞基本生命活动必不可少的。研究证明，细胞分化是奢侈基因按一定顺序表达的结果，表达的基因数约占基因总数的5%～10%。也就是说，某些特定奢侈基因表达的结果生成一种类型的分化细胞，另一组奢侈基因表达的结果导致出现另一类型的分化细胞。因此细胞分化的关键是细胞按照一定程序发生差别基因表达（differential gene expression），开放某些基因，关闭某些基因。另外，分化细胞间的差异往往是一群基因表达的差异，而不仅仅是一个基因表达的差异。在基因的差异表达中，包括结构基因和调节基因的差异表达，差异表达的结构基因受组织特异性表达的调控基因的调节（图 13-20）。

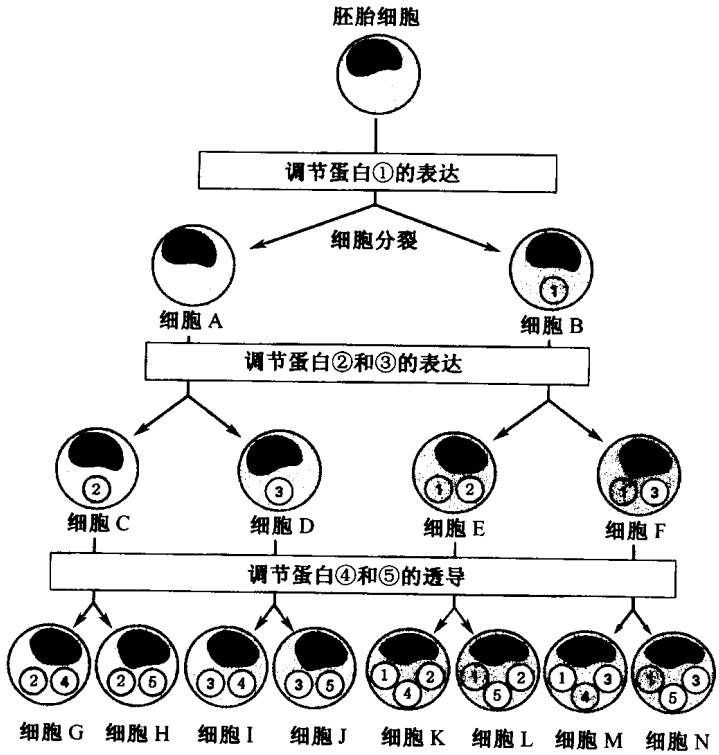


图 13-20　多基因的差别表达对发育的控制（引自 Alberts *et al*., 1994）

图中高度概括显示了几个调节基因合成的调节蛋白如何调控多种类型细胞的发育，主要是通过基因的差异表达。

13.3.2　真核生物基因表达的调控

真核生物细胞分化的本质是基因选择性表达的结果。当然，真核生物基因的选择性表达不仅导致了细胞分化，同时也维持了各种不同类型细胞的正常功能。

基因表达的调控发生在各种水平，包括 DNA 水平、转录水平、转录后加工水平、翻译水平等，受多种因素的影响。

13.3.2.1 基因组调控：DNA 甲基化与 DNA 重排

基因组控制（genomic control）主要是在 DNA 水平上调节基因的活性，其中两种重要的方式是 DNA 甲基化和 DNA 重排。

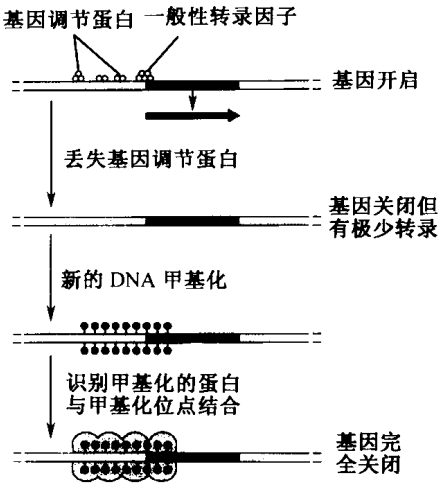


图 13-21 DNA 甲基化对基因活性的调控
（引自 Alberts *et al*., 1994）

DNA 甲基化（DNA methylation）是在甲基转移酶的催化下，DNA 的 CG 两个核苷酸的胞嘧啶被选择性地添加甲基，形成 5-甲基胞嘧啶，这常见于基因的 5′-CG-3′序列。大多数脊椎动物基因组 DNA 都有少量的甲基化胞嘧啶，主要集中在基因 5′端的非编码区，并成簇存在。甲基化位点可随 DNA 的复制而遗传，因为 DNA 复制后，甲基化酶可将新合成的未甲基化的位点进行甲基化。DNA 的甲基化可引起基因的失活（图 13-21）。在大鼠个体发育过程中，核内 DNA 甲基化的程度不同，14d 的胚胎肝只有 8% rDNA 甲基化、18d 的胚胎肝有 30% rDNA 甲基化、而成年的大鼠肝组织 rDNA 的甲基化程度高达 60%。

体外的实验表明，降低 DNA 的甲基化，可提高基因的活性。实验中使用了一种胞嘧啶的类似物：5-氮胞苷（5-azacytidine），这种物质由于在可甲基化位点的碳原子被氮原子取代了，不会被甲基化。在 DNA 的体外合成中，用 5-氮胞苷取代胞苷，致使新合成的 DNA 中甲基化程度降低，从而激活了一些基因的表达。

另外，用限制性内切核酸酶 *Msp* I、*Hpa* II 绘制基因组 DNA 的酶切图谱，可获得 DNA 甲基化影响基因活性的直接证据。这两种酶的识别序列都是 - CCGG -，但是，*Hpa* II 只能切割未甲基化的 - CCGG -，如果第二个 C 被甲基化了就不能切割。而 *Msp* I 能够识别和切割甲基化或未甲基化 - CCGG -，比较这两种酶切割 DNA 产生的 DNA 片段的差异，可发现不同组织中 DNA 甲基化的程度是不同的，具有 *Msp* I 组织特异性。例如，在不产生血红蛋白的组织中，珠蛋白基因 5′端附近的 CG 序列是被甲基化的，而在红细胞中，珠蛋白基因 5′端附近的 CG 序列未被甲基化。

DNA 甲基化可抑制基因的转录，确切的机制目前尚不清楚。据推测，甲基化促使染色质凝聚，这样，DNA 转录因子和 RNA 聚合酶就不能够与 DNA 结合。

DNA 重排（DNA rearrangement）是基因活性调节的另一重要方式。这种调节主要是根据 DNA 片段在基因组中的结构变化，最熟知的两个例子是酵母交配型的控制和不同抗体的产生，下面简要介绍酵母交配型控制中的 DNA 重排。

酿酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）发生交配时，是两个不同的交配型的单倍体细胞 *a* 和 *a* 融合形成一个二倍体的细胞。所有的单倍体细胞都携带有交配型的两个等位基因，但实际上，细胞交配能力主要取决于基因组特定位点 *MAT* 基因座中的两个等位基因 *a* 或 *a*。细胞通过交替改变 *MAT* 基因座中的等位基因，控制细胞的交配型。这种 DNA 重排称为盒式机制

(cassette mechanism)，交配型的基因座像是一个盒式播放机，α 带或 a 带（等位基因）都能插进去播放（转录）。图 13-22 详细描述了酵母盒式机制的调控方式。

酵母 3 号染色体的 *MAT* 基因座的等位基因决定酵母的交配型，但是基因座的两侧各有一个重复的基因座，左侧的为 *HMLα*，右侧的为 *HMRa*，在交配型转换中，酵母细胞从两侧的基因座中制造一个等位基因拷贝，α 或 a，并将之插入 *MAT*。在新的拷贝插入之前，*MAT* 基因座原有的 DNA 被位点特异的内切核酸酶切除，但 *HMLα* 和 *HMRa* 基因座的 DNA 从不会被切除。在 3 个等位基因座中，只有 *MAT* 能决定细胞是 α 交配表型或是 a 交配表型，因为 *MAT* 基因座两侧基因的转录被 *SIR* 基因产物所抑制，所以它们不会转录，但能够进行复制，为 *MAT* 基因座的基因转换提供拷贝。

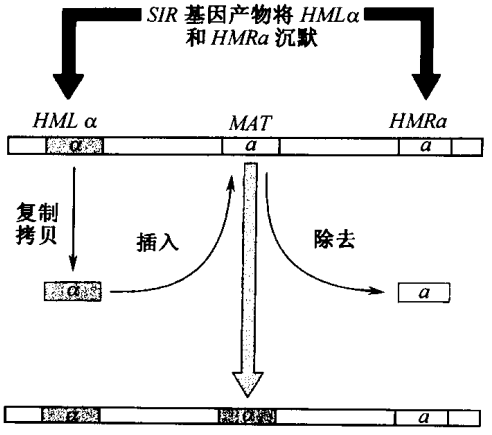


图 13-22　酵母交配型转换的盒式机制
（引自 Becker *et al*., 1996）
酿酒酵母 3 号染色体上含有交配型信息的 3 个拷贝，*HMLα* 和 *HMRa* 基因座分别含有两个互补基因的一个拷贝，α 和 a，但是这两个基因座的转录都受 *SIR* 基因抑制，所以，细胞的实际交配型是受 *MAT* 基因座的基因控制。当细胞转化交配型时，*MAT* 基因座的 α 或 a 被另一种交配型 DNA 的拷贝替换，图中 *MAT* 基因座的 a 被 α 取代，使 *HML*、*MAT*、*HMR* 3 个位点的基因发生重排，改变了交配型。

13.3.2.2　转录水平的调控

转录控制（transcriptional control）是真核生物控制基因表达的重要调控方式，通过转录调控，控制着基因在不同组织中进行差异表达。近几年，通过实验比较哺乳动物不同组织细胞核中合成的 RNA 的差异获得了转录调控的直接证据。例如，肝组织和脑组织的功能是不同的，功能的不同主要是两种组织的蛋白质的不同所致。当然这两种组织中也有很多蛋白是相同的，它们是持家基因的产物。如何判断两种组织中差异蛋白的来源？如果两种组织的差异蛋白是由于差异转录的结果，那么，在肝组织和脑组织细胞的 RNA 群体中，就会有特异 mRNA 的存在。另外，如果这两种组织功能的差异不是基因表达的差异，那么，它们细胞核中转录的 mRNA 的种类就没有差异。因此，只要在细胞核中找到组织特异的 mRNA，就可证明功能差异是基因转录的差异。图 13-23 就是基于这样的思路设计的实验结果。

控制基因差别转录的方式有很多种，但主要是通过对转录起始的控制，它涉及相当多的转录因子的作用，包括在第 11 章中介绍的组织特异性结合蛋白的作用。这些转录因子同基因上游的特定 DNA 序列相互作用，形成特别的复合物控制转录的起始。真核生物有 3 种 RNA 聚合酶，不同的 RNA 聚合酶所需的转录起始复合物是不同的。图 13-24 是典型的真核生物基因转录起始的调节。

在进行影响果蝇发育突变的研究中，发现了一些有关控制动物体态形成的基因，其中最重要的同源异型基因（homeotic gene）。如果此类基因发生了突变，就会在胚胎发育过程中出现特别奇怪的现象：出现某一器官异位生长，即本来应该形成的正常结构被其他器官取代了。

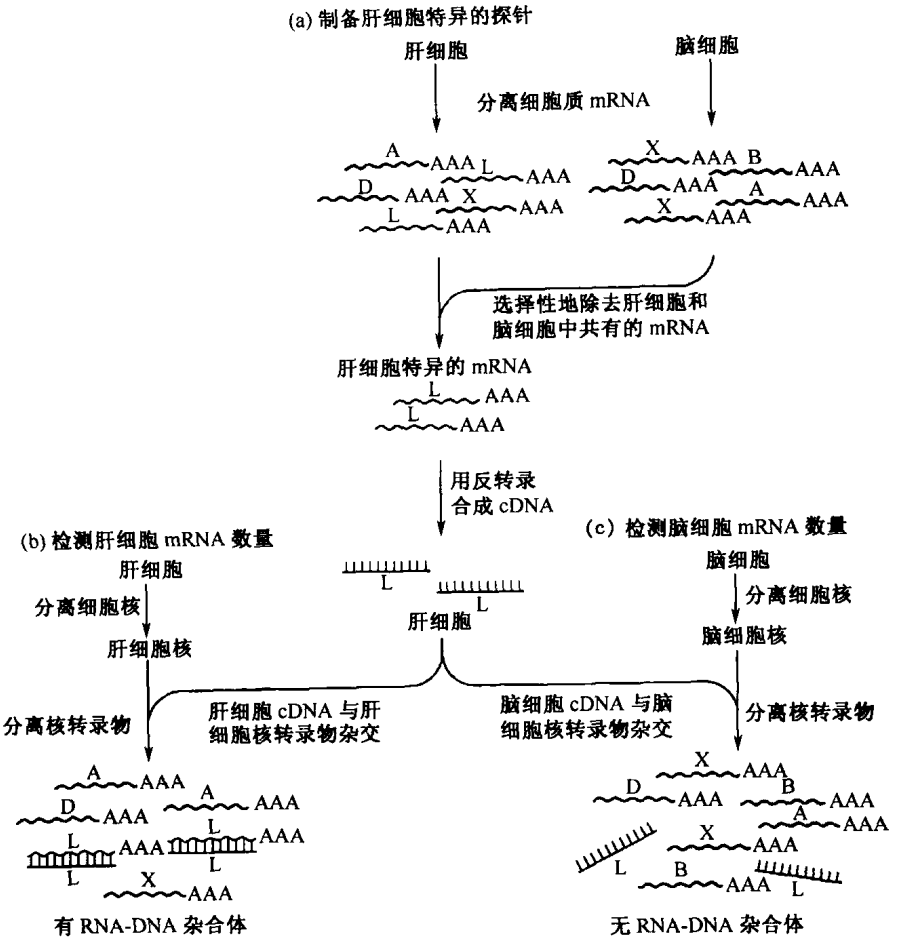


图 13-23　真核生物基因表达转录控制的实验证明（引自 Becker *et al*., 1996）

通过杂交实验可证明肝细胞和脑细胞中 mRNA 群体的差异：(a) 分离肝细胞和脑细胞的细胞质 mRNA，然后将在两种类型细胞中都出现的 mRNA 选择性的剔除，再将肝细胞特异的 mRNA 反转录成 cDNA，制备成肝组织特异的探针。用制备的肝细胞特异的探针对肝细胞核 RNA (b) 和脑细胞核 RNA (c) 进行杂交检测，结果与预期的一致：来自肝细胞的核RNA能够与肝细胞特异的探针杂交，而来自脑细胞的核RNA则不能与肝细胞特异的探针杂交，表明在这两种组织中进行了不同基因的差别转录。

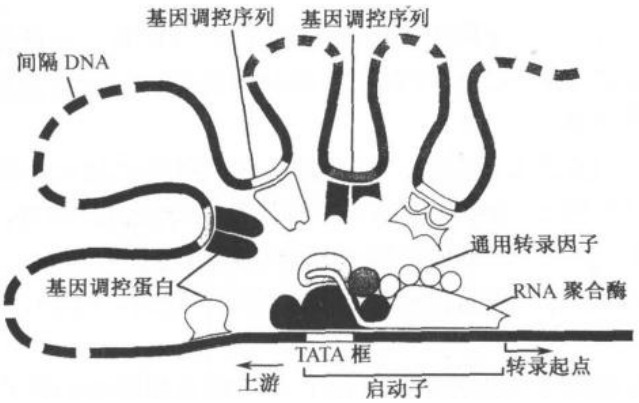


图 13-24　真核生物基因转录起始的调控（引自 Alberts *et al*., 1998）

转录起始复合物在启动子位点进行装配，参与装配的因子有基因转录因子、RNA 聚合酶、基因调控蛋白等。

例如，果蝇的同源异形基因 *Antp*（触角基因）的突变，导致果蝇的一对触角被两条腿所取代(图 13-25)。虽然这种现象在自然界极少发生，但可以提示 *Antp* 基因在胚胎发育中的正常功能是帮助体表结构的正确形成。

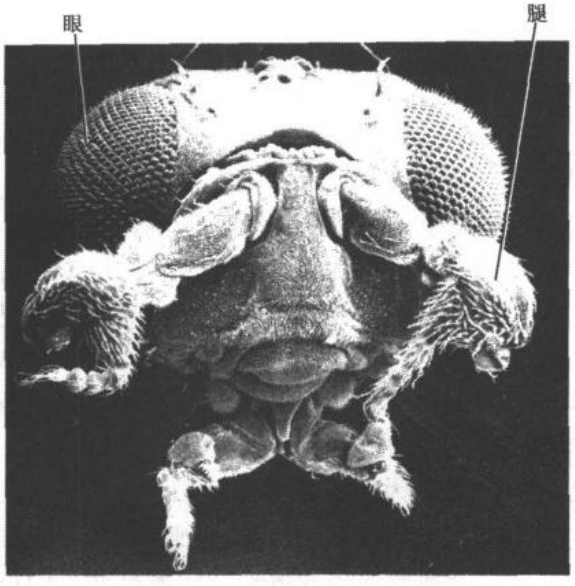


图 13-25　果蝇的触角基因突变，长触角的部位长出了腿（引自 Kleinsmith *et al*.，1995）

	1									10									20
鼠 *MO-10*	**Ser**	Lys	Arg	Gly	Arg	**Thr**	**Ala**	Tyr	Thr	Arg	**Pro**	Gln	**Leu**	**Val**	Glu	Leu	Glu	Lys	Glu	Phe
蛙 *MM-3*	Arg	Lys	Arg	Gly	Arg	Gln	Thr	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Gln	Thr	Leu	Glu	Leu	Glu	Lys	Glu	Phe
果蝇 *Antp*	Arg	Lys	Arg	Gly	Arg	Gln	Thr	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Gln	Thr	Leu	Glu	Leu	Glu	Lys	Glu	Phe
果蝇 *Ftz*	**Ser**	Lys	Arg	**Thr**	Arg	Gln	Thr	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Gln	Thr	Leu	Glu	Leu	Glu	Lys	Glu	Phe
果蝇 *Ubx*	Arg	**Arg**	Arg	Gly	Arg	Gln	Thr	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Gln	Thr	Leu	Glu	Leu	Glu	Lys	Glu	Phe
	21									30									41
鼠 *MO-10*	His	Phe	Asn	Arg	Tyr	Leu	**Met**	Arg	**Pro**	Arg	Arg	**Val**	Glu	**Met**	Ala	**Asn**	**Leu**	Leu	**Asn**	Leu
蛙 *MM-3*	His	Phe	Asn	Arg	Tyr	Leu	Thr	Arg	Arg	Arg	Arg	Ile	Glu	Ile	Ala	His	**Val**	Leu	Cys	Leu
果蝇 *Antp*	His	Phe	Asn	Arg	Tyr	Leu	Thr	Arg	Arg	Arg	Arg	Ile	Glu	Ile	Ala	His	Ala	Leu	Cys	Leu
果蝇 *Ftz*	His	Phe	Asn	Arg	Tyr	**Ile**	Thr	Arg	Arg	Arg	Arg	Ile	**Asp**	Ile	Ala	**Asn**	Ala	Leu	**Ser**	Leu
果蝇 *Ubx*	His	**Thr**	Asn	**His**	Tyr	Ile	Thr	Arg	Arg	Arg	Arg	Ile	Glu	**Met**	Ala	**Tyr**	Ala	Leu	Cys	Leu
	41									50									60
鼠 *MO-10*	Thr	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Met	Lys	**Tyr**	Lys	Lys	**Asp**	**Gln**
蛙 *MM-3*	Thr	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Met	Lys	Trp	Lys	Lys	Glu	Asn
果蝇 *Antp*	Thr	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Met	Lys	Trp	Lys	Lys	Glu	Asn
果蝇 *Ftz*	**Ser**	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Met	Lys	**Ser**	Lys	Lys	**Asp**	**Arg**
果蝇 *Ubx*	Thr	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Met	Lys	**Leu**	Lys	Lys	Glu	**Ile**

图 13-26　鼠、蛙和果蝇的五个同源框基因的同源性比较（引自 Voet *et al*.，1995）

进一步研究发现 *Antp* 基因的3'端含有一段由 180 个碱基对组成的序列，这是一个高度保守的同源区域，与其他同源异型基因高度相似，该序列称为同源异型框（homeobox），简称同源框。这一段 DNA 序列编码 60 个氨基酸，被称为同源异型结构域（homeodomain）。同源框普遍存在于果蝇、鼠、人、蛙等生物中（图 13-26）。同源框基因进化历史之久、分布之广泛，说明它在发育中的作用十分重要。

已发现的 *Hox* 基因的产物基本上都是转录因子，同源框的蛋白质产物呈螺旋-转角-螺旋的立体构型，可以和 DNA 双螺旋的大沟吻合，附着于 TAAT 框的碱基上；由于它能识别所控制的基因启动子的特异序列，从而在转录水平调控基因表达。

Hox 基因大多在染色体上串联排列成簇、基因之间的距离很近，通常为 4～5kb，其线性排列顺序可能与各自表达区域相对应，例如在果蝇发育中，位于 DNA 5'端的 *Hox* 基因在接近其尾部的节段中表达，而位于 3'端的 *Hox* 基因在接近头部节段中表达。

Hox 基因的表达具有区域特异性（特别在胚胎发育阶段）。例如果蝇触须足基因和超级双胸基因只限于在头部和胸部的节段中表达，其表达量与发育的进程有关。*Hox* 基因表达的开和关，对个体发育和形态发生起到时间和空间上的调控作用。

同源异型框基因表达的产物蛋白为同源异型框蛋白（homeoprotein）。它由 5 个结构单位所构成：①保守的 N 端，通常以 MSSLYYXN 开始延伸大约 45 个氨基酸残基；②富含丙氨酸、丝氨酸、甘氨酸、脯氨酸、谷氨酸的可变区；③同源框肽，即位于同源异型框 N 端的保守五肽 IYPWM；④同源异型框结构域，即相应于同源框的氨基酸序列；⑤偏酸性的羧基端区域。

同源异型框蛋白定位于细胞核。同源异型框结构域具有较高的保守性，通过螺旋-转角-螺旋的结构模式与启动子或增强子序列相结合，从而实现基因调控作用。同一种同源异型框蛋白可能识别多种 DNA 调控序列，同一调控序列也可能结合多种同源异型框蛋白。

同源异形基因的突变称为同源异型突变（homeotic mutation）。这种突变可致使身体某一部位的性状特征在其他部位出现，并有可能干扰机体各部分的正常发育。除了上面介绍的触角被两条腿取代外，还发现一种同源异型突变的果蝇，叫做双胸突变（bithorax mutant），这种突变多长出一对翅膀（图 13-27b）。

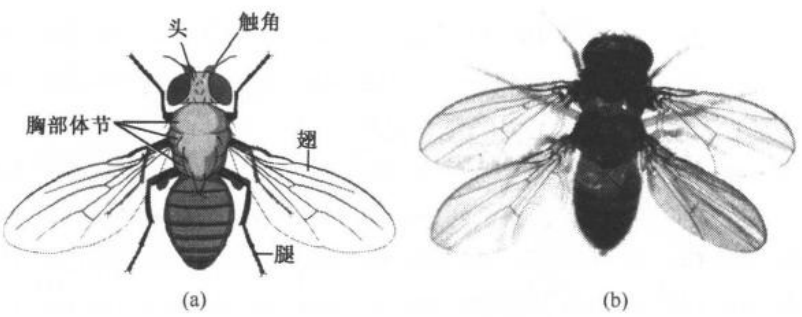


图 13-27　果蝇的双胸突变（引自 Becker *et al*., 1996）
(a) 正常果蝇；(b) 双胸突变体。

13.3.2.3 转录后加工的控制

真核基因转录产物要通过加工成为成熟的 mRNA，然后向细胞质运输。对转录产物加工的控制，也是调控的重要方式。

RNA 转录物加工的调节，分为两种类型：简单的转录单元，只能加工形成一种 mRNA；复杂的转录单元，可以加工形成几种不同的 mRNA。

简单的转录单元的加工主要是切除内含子。内含子的切除按“GU-AG”法则，即内含子的切除总是在 5′端以 GU 开始，在 3′端以 AG 结束。

在复杂的转录加工中，经不同剪接产生多个成熟 mRNA，表达不同的产物。有时某一基因的内含子在一种类型的细胞中是要被切除的内含子而在另外一种类型的细胞中却是外显子。例如有大鼠的一个基因可编码 7 种组织特异性的蛋白——α-原肌球蛋白（α-tropomyosin），这主要是通过改变剪接位点，以不同的剪接方式进行加工实现的（图 13-28）。

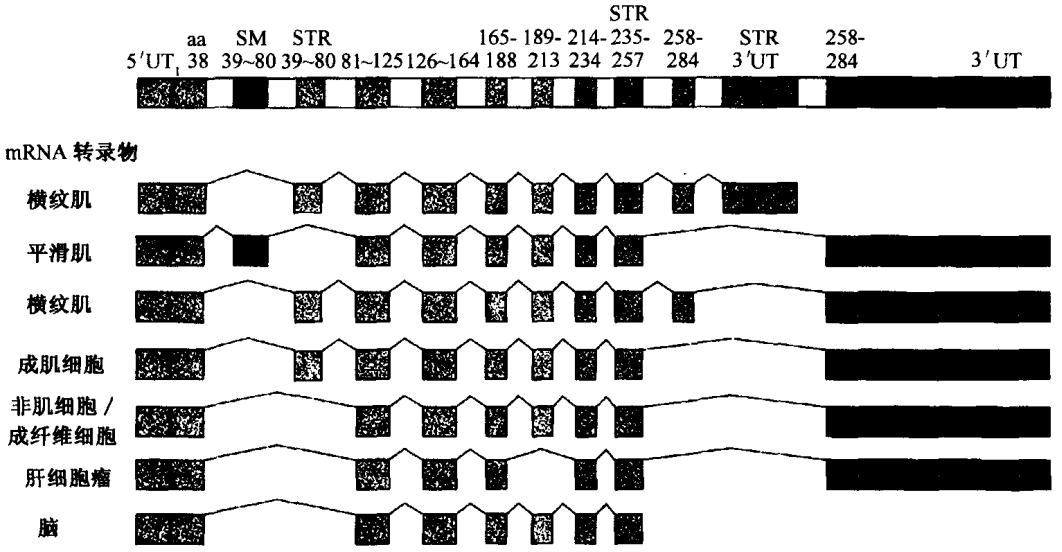


图 13-28 大鼠原肌球蛋白基因的转录和加工剪接（引自 Voet *et al*., 1995）

图的上方给出的是大鼠原肌球蛋白的基因结构，下方给出的是该基因转录后经可变剪接，在不同组织中形成 7 种不同的原肌球蛋白。细折线表示剪接前内含子部位，小方框表示出现在成熟 mRNA 中的外显子部分。

13.3.2.4 翻译水平的调控

翻译控制（translational control）有很多方式，包括控制蛋白质合成的速度、mRNA 稳定性的控制、翻译起始的控制等。

红细胞的血红蛋白的翻译控制是典型的控制蛋白质合成速度的例子。红细胞在发育过程中合成珠蛋白要依赖于血红素，发育中的红细胞合成珠蛋白的速率很高，但是，如果细胞中没有足够的血红素，合成的珠蛋白就会有浪费，因为珠蛋白只有同血红素结合形成血红蛋白后才有用。于是，红细胞形成了一种机制，根据血红素的多少来控制珠蛋白的合成。

该机制涉及一种血红素控制的抑制剂（heme-controlled inhibitor，HCI）的蛋白激酶，该激酶的活性受血红素调节，图 13-29 是 HCI 的调节机制。

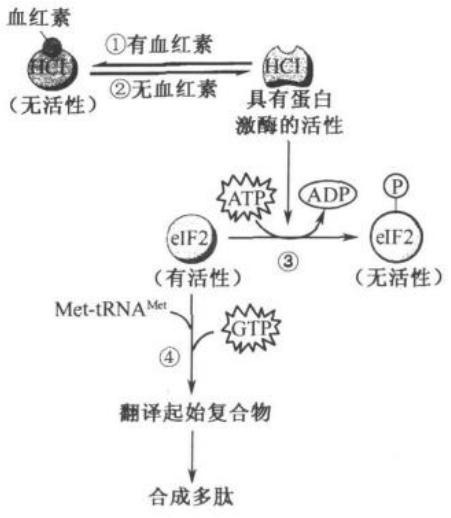


图 13-29　发育的红细胞中血红素对翻译的调控作用（引自 Becker *et al*., 1996）

发育中的红细胞的主要功能是合成血红蛋白。血红蛋白是由 4 个珠蛋白和 1 个血红素辅基构成。红细胞含有 HCI 蛋白（血红素控制的抑制剂），它根据血红素的量来调节蛋白质的合成：①血红素与 HCI 结合，使 HCI 失去活性；②当细胞缺乏血红素时，HCI 具有活性；③激活的 HCI 可作为一种蛋白激酶。催化 eIF2 磷酸化；④当有血红素时，珠蛋白的合成得以进行。

细胞中有血红素时，HCI 被失活；如果没有血红素，HCI 将真核起始因子 2（eukaryotic initiation factor 2，eIF2）磷酸化，并抑制其作用。由于 eIF2 是真核生物转录的重要起始因子，它被抑制后，不能与 GTP、甲酰 tRNA 形成翻译必需的起始复合物，所以细胞内所有的蛋白质的合成都被抑制。红细胞中珠蛋白的量占 90％以上，红细胞中蛋白质合成被抑制，珠蛋白的合成也就停止了，这是在没有血红素时引起的，对细胞生存是有利的。

珠蛋白合成的控制是细胞通过蛋白质的磷酸化来控制翻译速度的范例，是一种非特异性的调控；而铁蛋白翻译的控制则是细胞在 mRNA 水平特异性控制某一基因表达的经典例子（图 13-30）。

细胞中游离铁离子浓度过高时对细胞具有毒害作用，铁蛋白可螯合细胞质中的游离铁离子从而保护细胞。铁蛋白的翻译受一种阻抑蛋白的调节，而这种阻抑蛋白的活性状态与细胞质中游离铁浓度相关。调节铁蛋白合成的阻抑蛋白有两个结合位点，一个是铁离子结合位点，另一个是同铁蛋白 mRNA 5′端铁效应元件（iron-response element，IRE）结合位点。当细胞质中铁原子的浓度较低时，阻抑蛋白不与铁结合而是与铁蛋白 mRNA 的 IRE 结合，从而阻止了铁蛋白 mRNA 的翻译；当细胞中铁的浓度升高对细胞产生危害时，游离铁同阻抑蛋白的铁结合位点结合，使阻抑蛋白脱离 IRE，从而使铁蛋白 mRNA 得以翻译。

翻译水平的调控在卵母细胞中具有重要作用。未受精的卵细胞中携带有大量的 mRNA，但这些 mRNA 在发育的早期不能进行蛋白质的合成，一般将这些储存在卵细胞中为后期发育合成蛋白质用的 mRNA 称为“掩蔽”mRNA（masked mRNA），因为它们被一些蛋白质结合并抑制了活性。将从未受精的海胆卵细胞制备的细胞质悬浮液与放射性标记的氨基酸一起温育，很少有放射性掺入到蛋白质中；但是，如果从加入精子后的卵细胞中制备同样的悬浮液与放射性标记的氨基酸一起温育就能在蛋白质中检测到放射性，并且放射性掺入的速度逐渐加快并持续几小时；随着受精卵发育进入囊胚

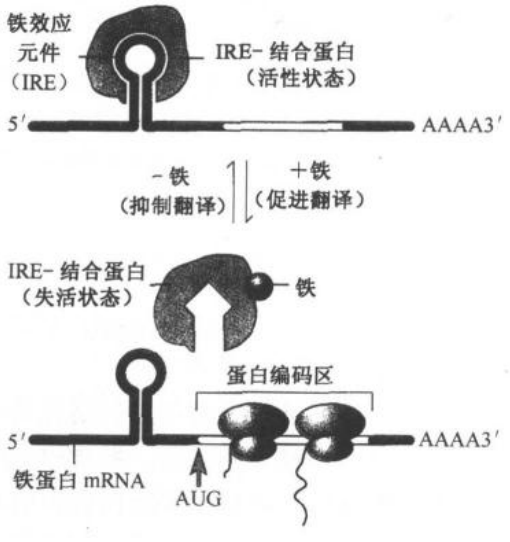


图 13-30　铁蛋白 mRNA 翻译的调控（引自 Karp，1996）

期，放射性氨基酸掺入的速度下降直到一个相对平衡的水平(图 13-31)。卵细胞受精后的蛋白质合成从无活性到有活性的转变速度如此之快，表明合成蛋白质的模板不可能是新合成的mRNA，如果在受精卵中加入 RNA 合成抑制剂放线菌素 D，受精卵中蛋白质合成的速度同样很快，这进一步证明蛋白质的合成不是新合成的 mRNA 所致。对于受精卵中蛋白质合成模板的来源，只能有一个解释：是卵细胞中预先存在的，但被抑制蛋白结合抑制了作用的mRNA，受精后释放了与之结合的抑制蛋白，并在预先存在于细胞质中一种酶的作用下在 3′端加长了 polyA 尾而激活。

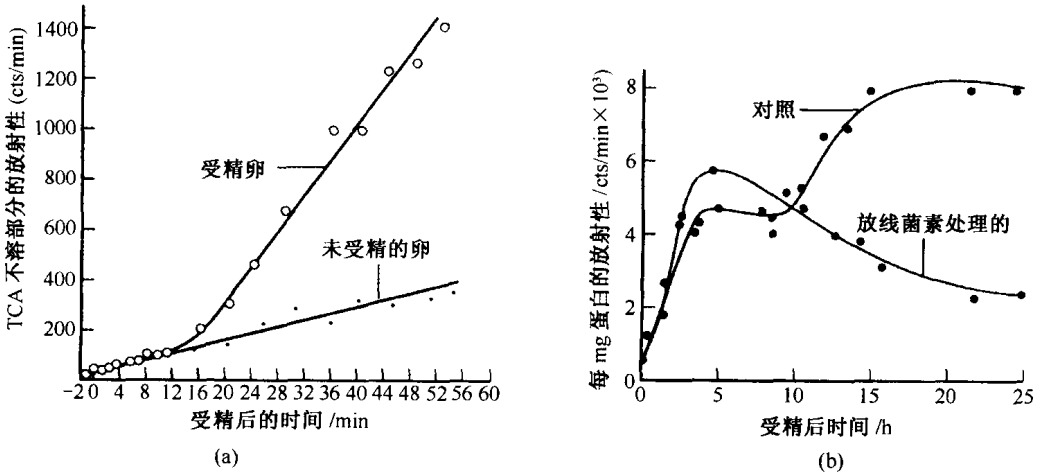


图 13-31　海胆卵细胞受精后掩蔽 mRNA 激活的实验证明（引自 Karp, 1996）

(a) 卵细胞受精前后蛋白质合成的同位素标记实验；(b) 受精后放线菌素 D 的抑制实验，详见正文。

13.3.2.5　翻译后加工的控制

原核和真核生物中合成的多肽都要进行酶的切割和共价修饰，这种翻译后的加工对于酶活性的调节是非常重要的。在真核生物中许多激素的合成都是以一个共同的前体合成的，称

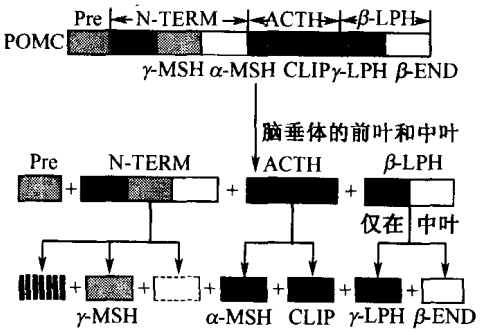


图 13-32　POMC 的组织特异性的转翻译后加工（引自 Voet *et al.*, 1995）

POMC 经组织特异性的翻译后加工产生两套不同的多肽激素。在脑垂体的前叶和垂体中叶中，POMC 被蛋白酶解，生成 3 个片段：N 端片段（N-terminal fragment, N-TERM）、促肾上腺素（ACTH）、β-促脂解素（β-lipotropin, β-LPH）。但是在垂体中叶，多肽激素要被进一步切割产生 5 种不同的激素：促黑激素（γ-melanocyte stimulating hormone, γ-MSH）、α-MSH、类促肾上腺皮质素垂体中叶肽（corticotropin-like intermediate lobe peptide, CLIP）、γ-LPH、β-内啡肽（β-endorphin）。

为聚蛋白，然后切割成不同的蛋白质。但是在不同的组织中，切割的方式是不同的，因此相同的基因在不同的组织中合成不同的激素蛋白。例如多肽蛋白阿黑皮素原（proopiomelanocortin, POMC），在大鼠的脑垂体的前叶和中叶都能合成，在前叶只被切成 ACTH 和 β-LPH，但是在垂体中叶要继续被切成几个小肽（图 13-32），它们具有不同的功能。

13.3.3 果蝇发育的调控

线虫（nematoe）、果蝇（fruit fly）、斑马鱼（zebra fish）、小鼠（mice）和植物中的拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）等已成为发育研究的模式生物，这些模式生物的主要优越性在于它们在实验室中易于饲养（培养）和繁殖。其中果蝇只有 4 对染色体，生命周期短，是分化研究的重要模型动物，从黑腹果蝇（*Drosophila melanogaster*）发育研究中获得的许多分子事件已经被证实普遍适用于高等动物和人类。

13.3.3.1 果蝇的生活史与早期发育

果蝇的生活史（life cycle）中包括从胚胎到成体的程序化完全变态（metamorphosis）过程，整个生活周期只需要 9～10d（图 13-33）。

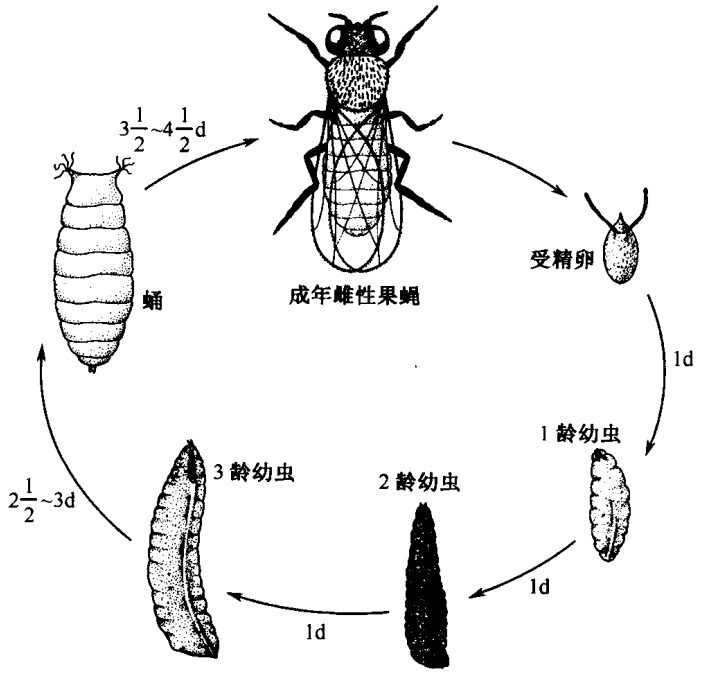


图 13-33 黑腹果蝇的生活史（引自 Hartl, 1991）

果蝇为双翅目昆虫，躯体分节。果蝇卵的大小约为 0.2mm×0.45mm，由卵发育为成虫果蝇大体经过 4 个阶段：卵、幼虫、蛹和成虫。果蝇在胚胎阶段有两个最重要的特征：极性（polarity）和分节（metamerism）。果蝇的卵从卵巢中排出时，它的细胞质物质就有了明确的空间分布定位和有秩序的卵质结构，就如同动物极和植物极一样，它的前端和后端可明显分

辨。在胚胎的后期可见到体节，每一个体节都具有不同的特征。

所谓完全变态是指昆虫发育成成虫时的形态完全不同于幼虫。在果蝇的生活史中，有两种完全不同的形态，中间被变态过程隔开。一种是类似蚯蚓状的幼虫（larva），另一种就是成虫果蝇。变态期又称为蛹化（pupation）。果蝇的受精卵在一天之内就发育成幼虫，然后经过连续的 3 个幼虫发育阶段（称为龄期），此过程持续 4d 多。在早期胚胎建成过程中，幼虫体内会形成几十种尚未分化的细胞团，称为成虫盘（imaginal discs），变态期后不同的成虫盘可以逐渐发育为果蝇的腿、翅、触角和躯体的其他部分的结构（图 13-34）。

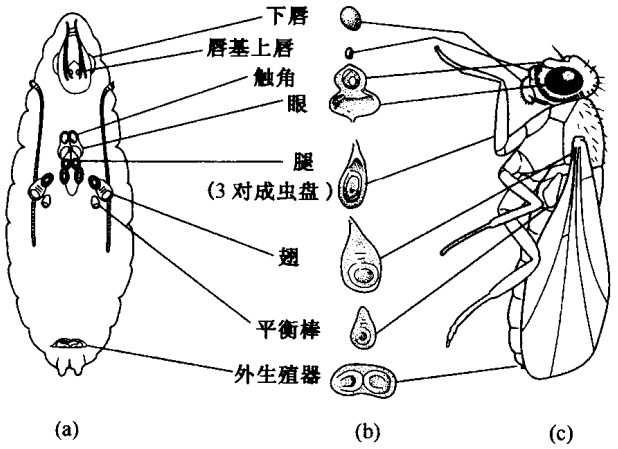


图 13-34　果蝇成虫盘的定位和发育的命运（引自 Hartl，1991）

(a) 9 对成虫盘和一个生殖成虫盘在幼虫中的相应部位；(b) 成虫盘在幼虫发育后的形态；(c) 发育成熟后成虫盘的结构。

前面我们讨论过，在卵细胞形成过程中，从周围的抚育细胞中获得大量的信息分子，储存在成熟的卵细胞质中，所以果蝇发育的蓝图，早在受精之前就已经规划完毕。果蝇卵母细胞的发育成熟分 3 个阶段（图 13-35）：第一阶段是卵子发生的早期，此时的卵母细胞的体积

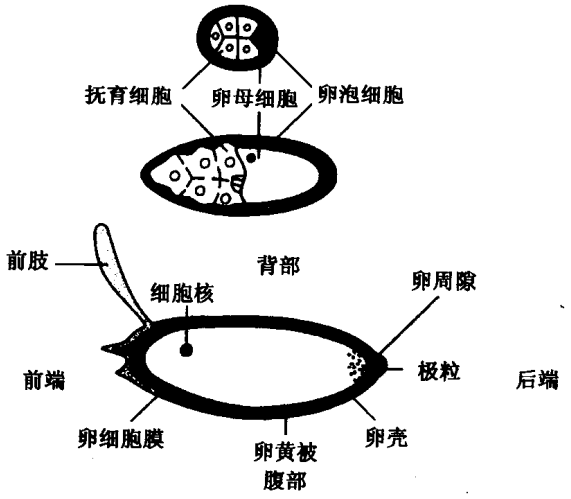


图 13-35　果蝇卵母细胞发育成熟的 3 个阶段及结构（引自 Lodish *et al*.，1999）

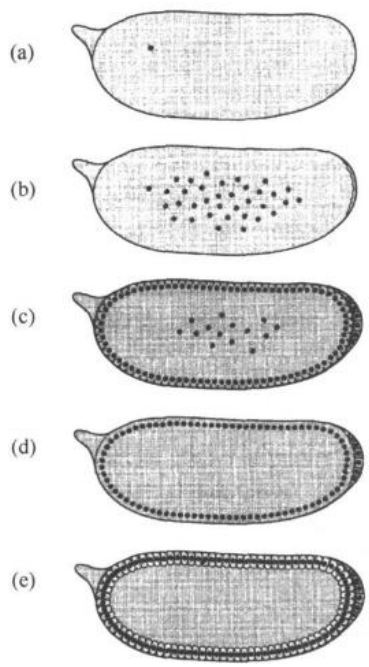


图 13-36 果蝇的早期发育（引自 Hartl，1991）

(a) 受精卵中有一个细胞核；(b) 核分裂形成多核的合胞体（syncytium）；(c) 一些核移向四周，在后端，与生殖相关的极细胞（pole cell）已经浮现；(d) 合胞体囊胚中继续进行核分裂；(e) 质膜内陷包围单个细胞核，生成细胞囊胚。

与其相邻的抚育细胞的大小相似。第二阶段，抚育细胞开始卵母细胞的成熟合成必需的 mRNA，卵泡细胞开始形成卵鞘（egg shell），期间，卵母细胞的体积逐渐增大。第三阶段，成熟的卵细胞被卵黄被和绒毛膜（chorion）包围，卵黄被和绒毛膜构成卵鞘。抚育细胞和卵泡细胞消失，但它们合成的 mRNA 分散分布在卵母细胞中。极性的颗粒结构定位于卵的后部，此区将发育成生殖细胞。成熟的卵细胞有明显的极性，即前后轴（anterior-posterior axis，A-P）、背腹轴（dorsal-ventral axis，D-V）。

一旦卵细胞受精，受精卵的细胞核开始分裂，并且每隔 6～10min，生成的子核也进行同步分裂，但不会形成核膜。在进行第 8 和第 11 轮核分裂之间，细胞核开始向四周迁移，围着卵黄形成单核层，这就是多核体的囊胚（图 13-36）。再经过几轮的分裂，细胞质膜向内凹陷，包围起细胞核形成单层细胞层，此即细胞的囊胚层。此时，不同种类的细胞分裂不再同步，它们发育的命运由所分割的细胞质中的信息决定。

13.3.3.2 母体基因对果蝇早期发育模式的调控作用

通过对影响果蝇早期发育突变的系统分析发现了母体基因（maternal gene）调节体轴的决定。在卵母细胞成熟过程中，这些基因在抚育细胞中转录，然后将合成的 mRNA 运送到卵母细胞，这些 mRNA 翻译合成的蛋白质在早期胚胎发育中调节合子基因的转录，故此将它们称为母体基因。根据它们的作用，将母体基因分为 4 群，每一群在胚胎发育过程中控制不同区域的分化：①前部基因群（anterior-group gene），它们控制头和胸的发育；②后部基因群（posterior-group gene），控制腹节（abdominal segment）的发育；③端部基因群（terminal-group gene），调节最前部和最尾部区的发育；④背部基因群（dorsoventral-group gene），它们调控背部轴的发育。

在成熟的未受精的卵细胞中，母体基因转录的 mRNA 和蛋白质通过建立不同的浓度梯度，帮助卵细胞建立前后轴和背腹轴，即母体基因的产物沿着体轴成浓度梯度分布。某些母体基因合成的蛋白质通过扩散在细胞质中形成不对称分布，使得囊胚中的不同细胞带有不同量的母体基因的蛋白质，造成分化的差异。母体 mRNA 的产物包括转录激活物（transcriptional activator）、转录抑制物（transcriptional repressor）以及翻译抑制物（translational repressor），它们调节不同发育途径，构建不同的组织。

果蝇的前后轴很大程度上受 *bicoid*（*bcd*）和 *nanos* 基因产物影响。*bcd* 基因产物是主要的前部形态发生素（anterior morphogen），而 *nanos* 基因产物则是主要的后部形态发生素

(posterior morphogen)。由抚育细胞合成的 *bcd* 基因的 mRNA 定位于卵细胞的前端，与微管结合，不发生翻译。受精后翻译成 BCD 蛋白，并在第 7 次核分裂时从前端向后扩散，沿 A-P 轴形成浓度梯度（图 13-37a），这为以后的 A-P 轴模式形成提供了位置信息。

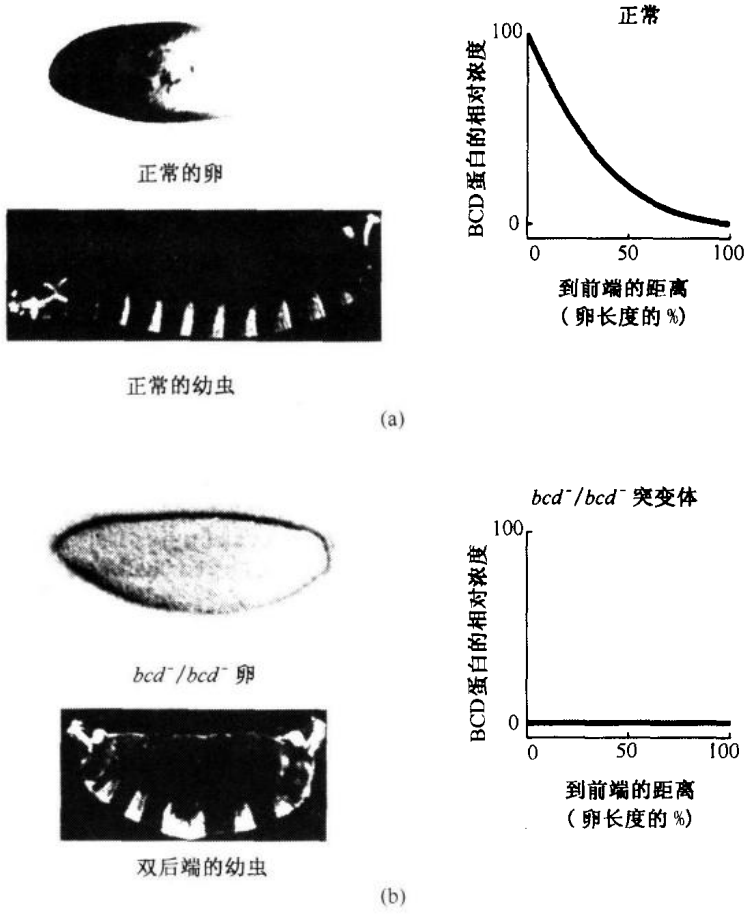


图 13-37　母体基因的产物在果蝇中的分布（引自 Nelson *et al*.，2000）

（a）免疫法染色的卵细胞形态，图中显示的是正常发育的果蝇 *bcd* 基因产物的分布；（b）如果 *bcd* 基因在母体中没有表达（bcd^-/bcd^- 突变体），卵的前端就没有 *bcd* 基因产物，这样的胚胎将会发育成两个后端。

BCD 蛋白是一种转录激活因子，能够激活很多体节基因的表达；同时，BCD 蛋白也是一种翻译阻抑物，能够使某些基因失活。在胚胎的不同部分 BCD 蛋白的量是不同的，因而调节一些按阈值表达的基因活性，也就是说被调节的基因是转录激活还是翻译阻抑，由所在部位的 BCD 蛋白的浓度阈值决定。如果 BCD 蛋白的浓度梯度曲线发生巨大变化，将会极大影响果蝇体形的发育模式。缺少 BCD 蛋白，这样的胚胎将发育成双腹，同时既没有头又没有胸（图 13-37b）。但是，如果将适量的 *bcd* mRNA 在合适的部位注入卵细胞，就会发育正常。*nanos* 基因具有类似的作用，但是它的 mRNA 定位于卵的后端。Nanos 蛋白是翻译阻抑物。

bcd 和 *nanos* mRNA 除了不对称分布外，还影响编码 Caudal、Pumilio、Hunchback 蛋白的 mRNA 的活性（图 13-38）。

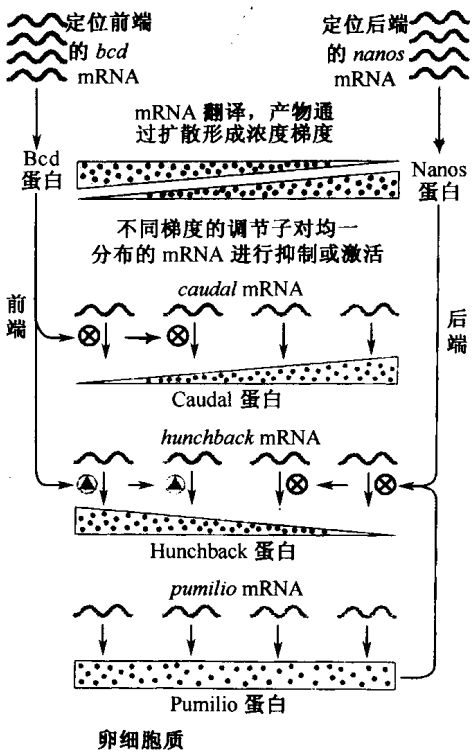


图 13-38 果蝇卵细胞前后轴关键的调控事件
（引自 Nelson *et al*., 2000）

bcd 和 *nanos* mRNA 分别定位在前后端附近，*caudal*、*pumilio*、*hunchback* mRNA 分布在整个卵细胞质中。BCD 和 Nanos 蛋白的梯度导致 Hunchback 蛋白在前端积累、Caudal 蛋白在后端积累。Pumilio 蛋白是 *hunchback* 基因翻译的阻抑物，但它的活性需要Nanos蛋白的激活，所以 Pumilio 蛋白只在后端发挥作用。

Caudal 和 Pumilio 蛋白参与果蝇后端的发育。Caudal 蛋白是一种具有同源异形框的转录因子，Pumilio 蛋白是一种转录阻抑物。Hunchback 蛋白在果蝇前端发育中具有重要作用，它能够调节很多基因的转录活性，作用方式既有正控制又有负控制。BCD 蛋白阻抑了 *caudal* mRNA 在前端的翻译，并且作为转录激活因子激活 *hunchback* 基因在囊胚中进行转录。由于 Hunchback 蛋白既能通过母体的mRNA表达，又能通过发育的卵细胞中的基因转录表达，所以它具有母体基因和体节基因（segmentation gene）的双重功能。BCD 蛋白的激活作用使得卵细胞前端 hunchback 蛋白浓度升高。Nanos 和 Pumilio 蛋白作为 *hunchback* 基因转录的阻抑物，阻抑卵细胞后端的 Hunchback 蛋白的合成。在没有 Nanos 蛋白时 Pumilio 蛋白没有功能，Nanos 表达的梯度限制着这两种蛋白在后端的活性。*hunchback* 基因翻译的阻抑作用导致前端附近的 *hunchback* mRNA 的降解，但是在后端缺少 BCD 蛋白就会引起 *caudal* 的表达，通过这种方式，Hunchback 和 Caudal 蛋白在卵细胞中形成不对称分布。

13.3.3.3 合子基因对果蝇发育的调控作用

母体基因的产物激活某些合子基因（zygotic gene）表达是胚胎模式形成的开端。合子基因分为若干组，表达顺序有先有后，它们之间有着严密的连锁关系，协调有序地调控着胚胎发育的模式形成。

缺口基因（gap gene）是沿果蝇前后轴最早表达的合子基因，它们均编码转录因子，参与果蝇胚胎前后轴早期模式的形成。胚胎尚处于合胞体胚层阶段时，沿前后轴的 Bcd 蛋白梯度即启动了缺口基因的表达。缺口基因包括 *hunchback*、*giant*、*krüppel*、*knirps*、*tailness* 等。由于这组基因发生突变时会导致体节模式发生间隔缺失现象，所以将它们称为缺口基因。在卵细胞受精后的 2h 内，这些基因就会在各自特定的部位表达（图 13-39）。BCD 蛋白不仅在激活前部缺口基因（如 *hunchback* 基因）的表达中起关键作用，并且与 Caudal 蛋白控制多数后部基因的表达。

通过前后轴的母体基因和缺口基因的协同作用，果蝇胚胎被不同组合的转录因子划分成具有不同表达特性区域。这些转录因子在不同水平表达，以不同的组合将胚胎进一步划分成更小的特异发育的区域。

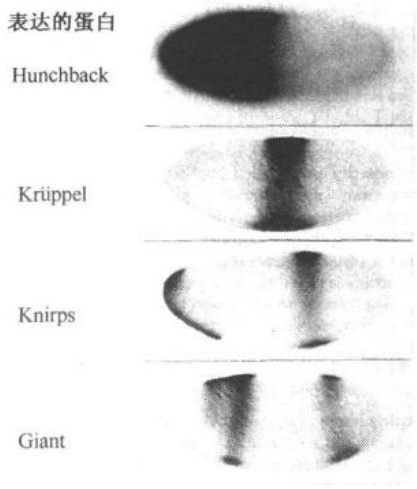


图 13-39　通过抗体染色显示的四种缺口基因产物在早期果蝇胚胎中的定位（引自 Lodish *et al*., 1999）

左边表示前部。Hunchback 蛋白具有转录激活和转录抑制两种功能，*krüppel*、*knirps*、*giant* 的转录受 Hunchback、BCD、Caudal 蛋白的控制。

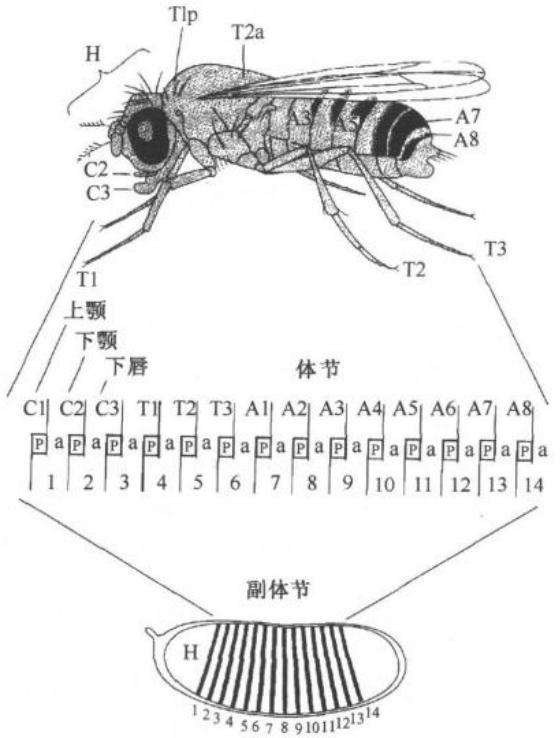


图 13-40　成年果蝇中体节与副节的关系

C1～C3 表示头部体节；T1～T3 表示胸节；A1～A8 表示腹节；每一副节的前部边界用向下伸展的细线表示。每一个体节分成前部（a）和后部（p）。图中粗略标出了副节和体节的对应关系。

对控基因（pair-rule gene）、体节极性基因（segment-polarity gene）和选择者基因（selector gene）是另外 3 类合子基因，它们在进一步的区域特化中具有重要作用。如同母体基因和上面讨论过的几个缺口基因，对控基因和体节极性基因是瞬时表达的，它们的表达产物可用于建立选择者基因表达的空间区域。而选择者基因是从胚胎期开始到成年持续表达。这 3 类合子基因协同作用完成了果蝇早期的发育模式。

关于果蝇的体节有两个概念：体节（segment）和副节（parasegment）。通常讲的果蝇体节是肉眼可见的成年果蝇身上的节，每一体节都有自己的特性，因此体节不是发育单位。相反，副节是指胚胎沿前后轴由一套选择者基因作用后形成的空间区域（图 13-40），是发育的单位。

对控基因是控制副节形成的基因，由于这种基因发生突变，可引起每隔一节缺一节，故此称为对控基因。果蝇胚胎共分 14 个副节，每一个副节在特定的一组基因控制下成为一个独立的发育单位。前 3 个副节参与形成头部体节，再 3 个副节形成胸部体节，最后 8 个副节形成腹部体节。副节与后来的体节并不对应，每一个体节是由一个副节的后区和后一个副节的前区组成。胚胎前部的副节发生了融合，因此头区不分节。对控基因包括 *fushi*、*tarazu*、*hairy*、*even-skipped* 基因等，它们在细胞副节的条纹中表达，编码产物是转录因子。每一个对控基因在 7 个副节中表达，表达的副节可以是偶数，也可以是奇数副节，表达后产生 7 条

表达条纹。各种不同的研究结果表明条纹的出现为一渐变过程，条纹的最初边缘模糊，随后才逐渐明显。每一条纹中表达的基因分别受不同的间隔基因和母体基因编码的转录因子的控制，对控基因对不同浓度和不同组合缺口基因转录因子的反应，确定了每一条带纹的定位。

体节极性基因是一群多种多样的基因，它们的蛋白质产物和作用机制没有明显的相关性。这些基因发生突变时，往往使体节的前后极性颠倒，体节前部或后部发生镜像对映重复，故此称为体节极性基因，如 *wingless* 和 *engrailed* 基因。体节极性基因作用时，胚胎发生中的细胞化（cellularization）过程已经完成，所有的细胞都包有细胞质膜。因此，体节极性基因是在细胞中起作用，而不是在合胞体中起作用。进一步的发育模式则依赖于细胞间的信号传导。有几个体节极性基因编码的不同产物参与邻近细胞的发育事件。体节极性基因负责每一个体节内产生不同的细胞模式。体节极性基因也参与胚胎表皮突起小齿（denticle）的发育模式，每一种突起都是由不同的对控基因和体节极性基因协同控制的。体节极性基因也参与决定副节的极性和体表小齿的方向。如 *engrailed* 基因的表达产物为转录因子，它在每一副节的前区表达，它的表达确立了细胞谱系（cell linage）的限制边界。

13.3.3.4 同源异型选择基因对果蝇体节的调控

有两簇选择者基因在控制果蝇外部结构的正确发育途径中起关键作用：双胸复合物（bithorax complex，BX-C）和触角足复合物（antennapedia complex，ANT-C）。BX-C 含有 3 个结构基因，分别是：*Ultrabithorax*（*Ubx*）、*abdominal A*（*abdA*）和 *Abdominal B*（*AbdB*），它们各编码一种具有同源框的转录因子。这 3 个基因都含有很多内含子，这些内含子对于调节这些基因在不同副节进行不同的表达具有重要作用（图 13-41）。ANT-C 基因簇含有 5 个基因：*Labial*（*Lab*）、*proboscipedia*（*pb*）、*Deformed*（*Dfd*）、*sex combs reduced*（*scr*）和 *Antennapedia*（*Antp*）。这两簇基因都定位于 3 号染色体。ANT-C 簇编码的蛋白质控制 1～5副节的发育，BX-C 基因簇编码的蛋白质控制 6～14 副节的发育。

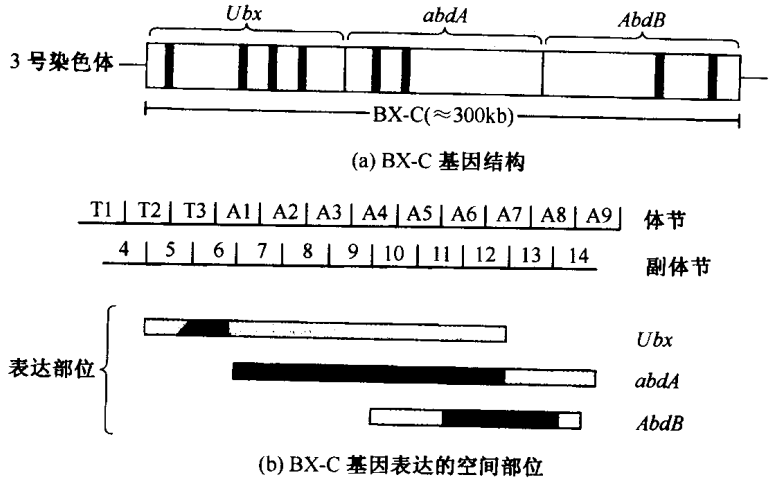


图 13-41 果蝇 3 号染色体中 BX-C 基因簇的组织结构（引自 Lodish *et al*., 1999）

(a) 三个基因都是从右向左转录，外显子（黑线）所占比例极小；(b) 三个基因在副节 4-14 中的表达模式，深色部分表示高浓度。

在哺乳动物中，ANT-C 和 BX-C 的基因的同源性发生在 4 个基因簇，并且定位在不同的染色体上，将它们称为 Hox-复合物（Hox-C）。果蝇的 ANT-C 和 BX-C 的基因簇的基因组织和相互关系，表明在进化的早期，这些基因的相互位置靠的很近，只是后来逐渐分开。由于果蝇的 ANT-C 和 BX-C 基因也具有同源框，所以将它们称为 Hom-C。

13.4 干细胞

干细胞（stem cell，SC）是一类具有自我更新（self-renewing）能力的多潜能细胞，在一定条件下，它可以分化成多种功能细胞（图 13-42）。

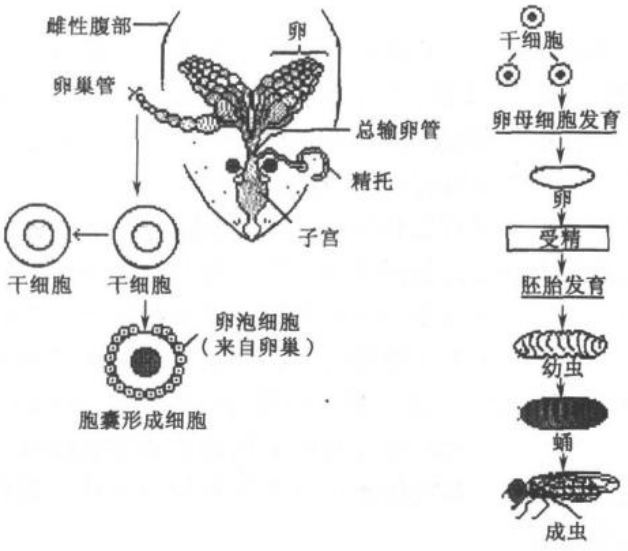


图 13-42 干细胞及其作用（引自 Alberts *et al*.，1998）

图中所示果蝇的干细胞先经分裂产生两个干细胞后，保留一个干细胞，另一个干细胞可分化产生一群有限分裂能力的分化细胞。

13.4.1 干细胞分类和特点

干细胞有两种分类方法，一是根据干细胞所处的发育阶段分为胚胎干细胞（embryonic stem cell，ES cell）和成体干细胞（somatic stem cell）。第二种分类方法是根据干细胞的发育潜能分为 3 类：全能干细胞（totipotent stem cell，TSC）、多能干细胞（pluripotent stem cell）和单能干细胞（unipotent stem cell）。胚胎干细胞的发育等级较高，是全能干细胞，而成体干细胞的发育等级较低，是多能或单能干细胞。

胚胎干细胞的分化和增殖构成动物发育的基础，即由单个受精卵发育成为具有各种组织器官的个体；成体干细胞的进一步分化则是成年动物体内组织和器官修复再生的基础。因为在细胞分化的过程中，细胞逐渐失去可塑性而发育成为高度分化的细胞。此时不仅丧失了其继续分化的能力，而且也失去再分裂的能力，最终衰老死亡。由于机体内的许多细胞的寿命很

短，需要不断被相应的新细胞替换。成体产生新的分化细胞有两种方式：①已分化细胞的分裂产生新细胞；②由未分化的干细胞产生新的分化细胞。

成体干细胞是一类成熟较慢但能自我维持增殖的未分化的细胞，这种细胞存在于各种组织的特定位置上，一旦需要，这些细胞便可按发育途径，先进行细胞分裂，然后经过分化产生出另外一群具有有限分裂能力的细胞群。

多能干细胞具有分化出多种细胞组织的潜能，但失去了发育成完整个体的能力，发育潜能受到一定的限制。骨髓多能造血干细胞是典型的例子，它可分化出至少十二种血细胞，但不能分化出造血系统以外的其他细胞。单能干细胞也称专能、偏能干细胞，这类干细胞只能向一种类型或密切相关的两种类型的细胞分化，如上皮组织基底层的干细胞、肌肉中的成肌细胞等。

干细胞具有几个显著的特点：①干细胞本身不是终末分化细胞（即干细胞不是处于分化途径的终端）；②干细胞能无限地分裂；③干细胞分裂产生的子细胞只能在两种途径中选择其一，或保持亲代特征，仍作为干细胞，或不可逆地向终末分化。从功能上来讲，干细胞不是执行已分化细胞的功能，而是产生具有分化功能的细胞。

干细胞有时可以根据其形态学特征和存在位置来辨认。如在果蝇的性腺和外周神经系统，干细胞与其外周的分化细胞有固定的组织方式，形成增殖结构单元。但对许多组织而言，干细胞的存在部位目前仍未确定，也没有与分化细胞截然不同的形态学特征。不同的干细胞具有各自特异的生化标志，这对于确定干细胞位置、寻找和分离干细胞有重要意义。如角蛋白15是确定毛囊中表皮干细胞的分子标志，巢蛋白为神经干细胞（neural stem cell，NSC）的标志分子等等。然而，干细胞生存的微环境可以影响其形态和生化特征，因此不能仅根据细胞的形态和生化特征来寻找干细胞。具有增殖和自我更新能力以及在适当条件下表现出一定的分化潜能是干细胞最基本的特点。

13.4.2 胚胎干细胞

胚胎干细胞是一种经人工操作能够发育成一个新个体的全能性二倍体细胞。它是从早期胚胎内细胞团（inner cell mass，ICM）或原始胚胎生殖细胞（embryonic germ cell，EG cell）经体外分化抑制培养分离克隆的。二者的形态、标志、体内分化潜能及种系传递功能都相似。

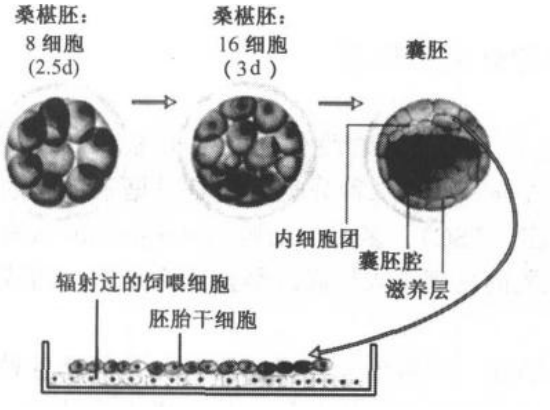


图 13-43 胚胎干细胞培养（引自 Lodish *et al.*，1999）
小鼠的受精卵细胞经卵裂 4 天半，形成囊胚，将此时的内细胞团分离培养在饲喂细胞（feeder cell）上。

13.4.2.1 胚胎干细胞的主要特性

ES 细胞有两个主要特性。首先 ES 细胞在不同条件下具有不同的功能状态，它是饲养层（feeder layer）细胞依赖的（图 13-43）。在有抑制因子存在的条件培养基中，它呈未分化状态生长；在无抑制因

子存在的培养基中，分化成各种细胞；在悬浮培养时，可形成胚状体（embryoid body，EB）。

第二，ES细胞具有发育分化成各种类型细胞的多潜能性，此种特性既可在体内发育，也可在体外诱导。体外与体内分化途径和机制在分子水平上有许多相似之处，而且体外研究更具有优点：①避免各种内源性因素干扰；②ES细胞始终保持存活、增殖和分化潜能，而在体内研究则存在胎死宫内、可能流产，使研究半途而废；③可制备各种模型更直观明了，而且可研究分化过程中的前祖细胞生物学特性。

13.4.2.2 胚胎干细胞的应用

ES细胞一经问世，就因其区别于其他培养细胞的生物学特征，而引起生物工程领域研究人员的关注，在开展ES细胞建系和定向分化研究的同时，以ES细胞为材料进行广泛应用的尝试。

作为生产克隆动物的高效材料　胚胎干细胞可以无限传代和增殖而不失去其基因型和表现型，以其作为核供体进行核移植后在短期内可获得大量基因型和表现型完全相同的个体。胚胎干细胞与胚胎嵌合生产克隆动物可解决哺乳动物远缘杂交的困难。另外，由于体细胞克隆动物存在成功率低、早衰、易缺陷易突变等问题，使胚胎干细胞的克隆研究显得十分重要。

生产转基因动物的高效载体　利用胚胎干细胞作载体使外源基因的整合筛选等工作能在细胞水平上进行，使操作简便可靠（图13-44）。

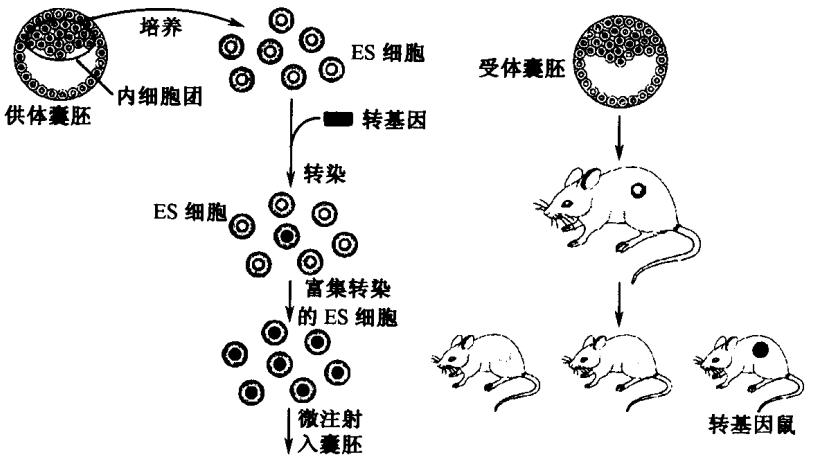


图13-44　用胚胎干细胞建立转基因鼠

从鼠囊胚内细胞团分离ES细胞，培养后作为转基因受体。转基因后经培养鉴定，选取阳性ES细胞，并重新注入代理母亲囊胚的内细胞团中，发育后获得嵌合体，经杂交筛选可获得转基因纯种。

发育生物学研究的理想体外模型　通过比较胚胎干细胞不同发育阶段基因转录和表达，可确定胚胎发育及细胞分化的分子机制，并发现新基因。

新型药物的发现筛选　利用胚胎干细胞体外分化的细胞组织检验筛选新药，可大大减少实验动物及人群数量。

加快组织工程发展　组织工程（histological engineering）是生物学和工程学相结合的一项技术，人工培育供移植用的人类或动物细胞、组织或器官，即将种子细胞人工培养生长在

支架（生物降解聚合物）上，培育出一定的组织或器官，这些组织或器官可移植给患者，达到临床治疗的目的（克隆治疗）。用 ES 细胞定向分化作为种子细胞，较已往用人或动物的组织细胞作种子细胞优越，数量大，生长快，取材容易。现在，英国正在用试验动物试验用 ES 细胞作核受体，用自身细胞作核供体，经细胞核移植分离克隆 ES 细胞，经定向分化，用作克隆治疗，解决异体移植的排异问题。同时，解决了用传统方法分离克隆 ES 细胞所用胚胎和卵母细胞的来源困难和伦理问题。

13.4.3 成体干细胞

在成体组织或器官中，许多细胞仍具有自我更新及分化产生不同组织细胞的能力，如血液细胞和皮肤细胞；此外在损伤情况下，肝等组织也表现出明显的补充损伤死亡细胞的能力，因此推测在成体中干细胞的存在，维持机体的正常功能。

造血干细胞（hematopoietic stem cell，HSC）和骨髓间质干细胞（mesenhymal stem cell）是熟知的成体干细胞。此外还有近来研究渐多的神经干细胞、肌干细胞（muscle stem cell）、成骨干细胞（osteogenic stem cell）、内胚层干细胞（endodermal stem cell）及视网膜干细胞（retinal stem cell）等。

13.4.3.1 造血干细胞

骨髓移植是临床治疗急性白血病、恶性淋巴瘤和重症贫血等血液系统疾病的重要手段，

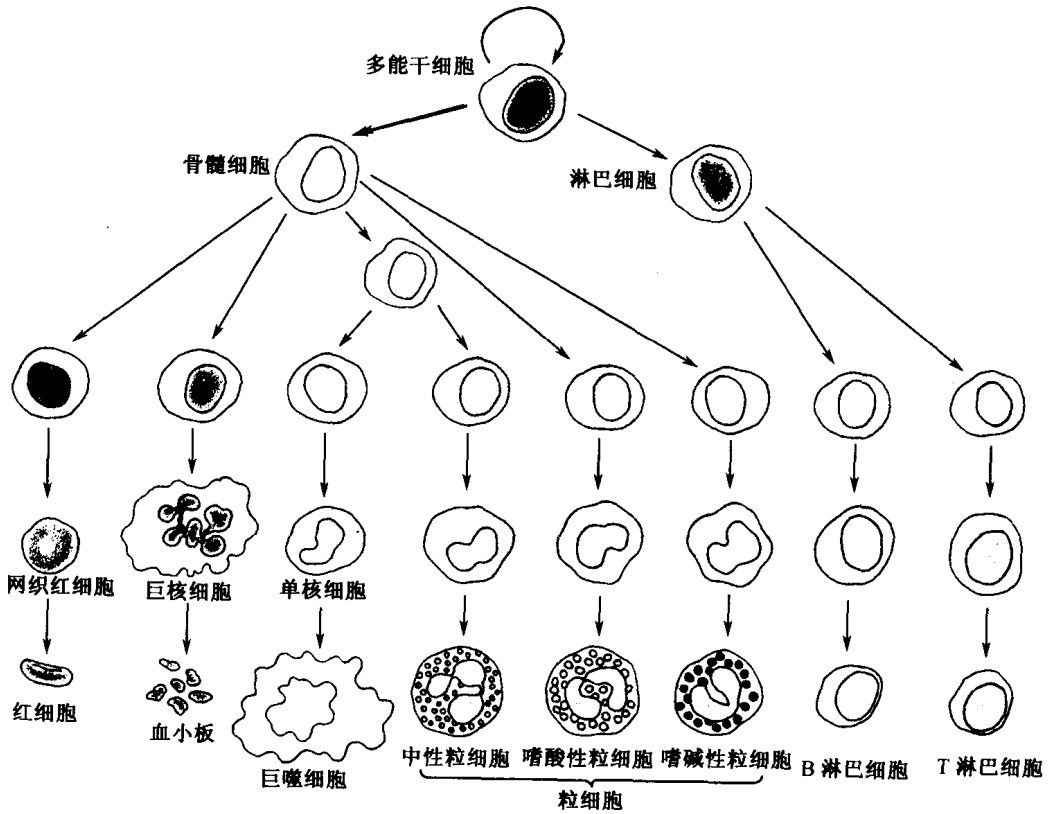


图 13-45 骨髓中的造血干细胞分化形成不同类型的血细胞（引自 Cooper，2000）

其技术核心就是骨髓中的造血干细胞。

造血干细胞在造血系统中发挥着至关重要的作用，对其深入研究的实质就是对血液系统的发生、发育及其调控机制的深入解析。由于血细胞具有分布广泛、来源丰富和体外分离培养技术也较为成熟等优势，HSC 已经成为目前人类 SC 研究中最为活跃的课题。

在适当的条件下，骨髓中的造血干细胞能够分裂形成两种类型的细胞：一种仍然作为干细胞，但另一种成为祖细胞（progenitor cell），即次一级的干细胞，又称为爆发集落形成单位（burst forming unit，BFU）和集落形成单位（colony-forming unit，CFU），因为它们可分裂形成多种类型的细胞群（图 13-45）。

13.4.3.2 神经干细胞

最早是从神经嵴干细胞（neural crest stem cell，NCSC）开始进行研究的，现在又成功分离了 NSC。NCSC 为外周神经干细胞，既可发育为外周神经细胞、神经内分泌细胞和 Schwann 氏细胞，也能分化为色素细胞（pigmented cell）和平滑肌细胞等。NSC 一般是指存在于脑部的中枢神经干细胞，其子代细胞能分化成为神经系统的大部分细胞。干细胞经不对称分裂产生 1 个祖细胞和另 1 个 SC。祖细胞只有有限的自我更新能力，并能自主分化产生成神经元细胞和成胶质细胞等，进而生成神经元及神经胶质细胞。以往认为，中枢神经系统的神经元在出生前或出生后不久，就失去再生能力。但近年的一些研究表明，成年哺乳动物的脑组织仍可不断产生新的神经元，成人脑组织中同样存在 NSC。因此，人们对神经系统再生的机制和神经系统疾病的治疗均有了新的认识。

为保持神经多能干细胞在体外长期生长、分裂和增殖，目前多使用基因转移的方法，建立神经干细胞系，即诱导 NSC 的细胞周期不断循环往复，从而阻止其分化过程。永生化的 NSC 具有较好的生物学特性，它们能自我复制并在体外大量增殖，在移植人体内后仍具有多向分化潜能，同时可被转染并稳定地表达外源基因。因此，具有广泛的应用前景，既可用于颅内神经细胞的移植，又可作为外源基因转移的载体，用于颅内肿瘤的基因治疗。

13.4.3.3 其他组织的干细胞

肌干细胞可发育分化为成肌细胞（myoblast），后者可互相融合成为多核的肌纤维，形成骨骼肌最基本的结构。成骨干细胞似乎具有更良好的分化潜能，它不仅可发育为成骨细胞（osteoblast）和成软骨细胞（chondroblast）；也能分化为成脂肪细胞（adipoblast）、成肌细胞和成纤维细胞（fibroblast）等。从理论上讲，成骨干细胞可再生骨、软骨、肌肉、肌腱、韧带和脂肪等多种组织，因而在生物材料学和整形外科学等领域中占有重要的位置。

提　要

动物和植物的雌配子通常称为卵，而将雄配子称为精子。配子形成的过程称为配子发生。在配子发生过程中，二倍体的原始生殖细胞要通过减数分裂和分化才能转化成单倍体的卵或精子。

在大多数动物中，卵子形成（即卵子发生）发生在卵巢，并且有一个增殖期。雄性的精子发生与卵子发生过程有很大的不同，它是在睾丸中通过精子发生过程产生的。

精子与卵子的融合，即受精作用。受精作用涉及的反应包括：顶体反应、皮层反应、原核融合等。

受精后胚胎的早期发育主要包括卵裂、胚泡形成和宫内植入 3 个阶段。

细胞分化是胚胎细胞分裂后未定形的细胞在形态和生化组成上向专一性或特异性方向发展，或由原来较简单具有可塑性的状态向异样化稳定状态发展的过程。细胞分化时的主要特征是细胞出现不同的形态结构和合成组织特异性蛋白质，演变成特定表型的细胞类型。其结果是，在空间上，细胞之间出现差异；在时间上同一细胞和它以前的状态有所不同，从本质上说，细胞分化是从化学分化到形态、功能分化的过程。

由于分化和形态建成是非常复杂的过程，影响的因素很多，包括：细胞黏合分子在胚胎发育中的作用、激素对分化和形态建成的影响、分化抑制作用、细胞分化中的核质关系的影响等。

细胞质不仅在细胞分化中具有重要作用，在成熟个体的组织中，细胞质对细胞核仍然具有影响。

从分子水平看，分化细胞间的主要差别是合成蛋白质种类的不同，即表达的基因不同，细胞分化的分子基础在于基因表达的控制。基因表达的调控发生在各种水平，包括DNA水平、转录水平、转录后加工水平、翻译水平等，受多种因素的影响。如果蝇的发育就是在母体基因、合子基因和同源框基因等的调节控制下进行的。

干细胞是一类具有自我复制能力的多潜能细胞，在一定条件下，它可以分化成多种功能细胞。胚胎干细胞的分化和增殖构成动物发育的基础，成体干细胞的进一步分化则是成年动物体内组织和器官修复再生的基础。干细胞在细胞工程和组织工程中有许多重要的应用。

14 细胞衰老、死亡与癌变

“生、老、病、死”是生命的四重奏。人类自出生总要经过生长、发育、成熟、衰老直至死亡的几个阶段，这是生命的必然规律。生命是物质的，人体是由细胞组织起来的。组成细胞的化学物质在运动中不断受到内外环境的影响而发生损伤，致使人体内某些细胞不断地衰老与死亡。如红细胞成熟后担负着为各组织细胞输送氧气、带走 CO_2 的任务，历尽千辛万苦，积劳成疾，随时在大量死亡与更新，因此，细胞的衰老与死亡是新陈代谢的自然现象。

癌是威胁人类健康的主要疾病之一。癌症与其他疾病的根本区别在于，癌是由一个细胞的变化引起的，与细胞的生长、发育、分化和凋亡有着十分密切的关系。研究癌变的细胞生物学机理，是御癌、治癌的基础。

14.1 细胞衰老

在生物机体内大多数细胞都要经历未分化到分化、分化到衰老、衰老至死亡的历程。因此，细胞总体的衰老反映了机体的衰老，而机体的衰老是以总体细胞衰老（cellular aging，cell senescence）为基础。

14.1.1 衰老的概念

人的生理寿命应该是多大岁数呢？按照生物学的原理，哺乳动物的寿命是其生长期的5～7倍，人的生长期是用最后一颗牙齿长出来的时间（20～25岁）来计算的，因此人的寿命最短100岁，最长175岁，公认人的寿命正常应该是120岁。但是，目前人的寿命远没有达到这一水平，其原因是衰老和疾病造成的。

习惯上将“衰”与“老”合起来使用，即衰老。其实“衰”与“老”是有差别的。老是指年龄超过某一界限，而衰是指功能或体力衰退，通常讲的“未老先衰”，就是这个意思。老年人由于年龄大，通常都有“衰”的表现，所以，当谈到老，就自然想到衰。

科学研究表明，现代人类面临着3种衰老：第一种是生理性衰老，是指随着年龄增长所出现的生理性退化，这是一切生物的普遍规律。第二种是病理性衰老，即由于内在的或外在的原因使人体发生病理性变化，使衰老现象提前发生，这种衰老又称为早衰。第三种是心理性衰老，心理活动是生理活动更高级的物质运动形式，人类由于各种原因，常常产生“未老先衰”的心理状态而影响机体的整体功能，这就是心理衰老的表现。

衰老（senescing，aging）是机体在退化时期生理功能下降和紊乱的综合表现，是不可逆的生命过程。人的衰老与细胞的衰老相关联。

细胞衰老是客观存在的。同新陈代谢一样，细胞衰老是细胞生命活动的客观规律。对多

细胞生物而言，细胞的衰老和死亡与机体的衰老和死亡是两个不同的概念，机体的衰老并不等于所有细胞的衰老，但是细胞的衰老是同机体的衰老紧密相关的。

14.1.2 细胞的寿限

细胞也同生物体一样，有一定的寿命，体内总有细胞不断地衰老与死亡，同时又有细胞的增殖与新生进行补充。这不仅发生在胚胎发育过程中，在成年体内的各组织器官中也有细胞的死亡。

14.1.2.1 Hayflick 界限

1961 年，Hayflick 首次报道了体外培养的人成纤维细胞（human fibroblast）具有增殖分裂的极限。他利用来自胚胎和成体的成纤维细胞进行体外培养，发现胚胎的成纤维细胞分裂传代 50 次后开始衰退和死亡（图 14-1），而来自成年组织的成纤维细胞只能培养 15～30 代就开始死亡。

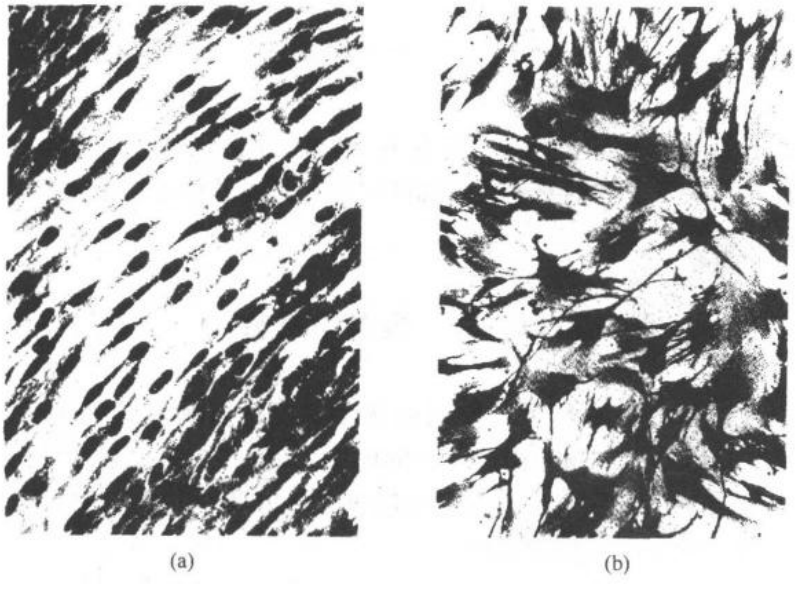


图 14-1 体外培养的年轻和老的人成纤维细胞的显微形态（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）
(a) 只分裂了几代的年轻成纤维细胞，呈现薄层、细长的形态；(b) 分离了 50 次的老的成纤维细胞，开始衰退，并很快死亡。

实验中，他们还从患有 Werner 综合征（一种早老症）的儿童身上分离成纤维细胞进行体外培养，只能传 2～10 代。Hayflick 等还发现，动物体细胞在体外可传代的次数，与物种的寿命有关。例如，Galápagos 龟的最高寿命是 175 岁，它的细胞在体外培养时能分裂 100 次。而小鼠的寿命只有几年，所以从小鼠分离的细胞在体外分裂的次数不超过 30 次（图 14-2）。

Hayflick 的实验表明，正常人成纤维细胞，在体外培养条件下，即使条件适宜，细胞也不能无限制地进行分裂，即使是机体中可以终生分裂的细胞，在体外培养时也有分裂次数的极限，即使给予丰富的营养、生长因子和足够的生长空间也是如此。而且细胞的分裂能力与

个体的年龄有关，例如从 40 岁个体获取的成纤维细胞在培养过程中只能分裂 40 次而不是 80 次，这就是细胞的衰老，也就是说细胞的衰老控制着细胞的分裂次数，进而控制着细胞的数量。这就是著名的 Hayflick 界限。这种在体外培养的细胞增殖传代的能力，反映了细胞在体内的衰老状况。因此许多科学家认为多细胞个体的衰老始于细胞的衰老，对体外培养细胞有限寿命的观察和研究，有助于人们了解机体衰老过程的某些规律。

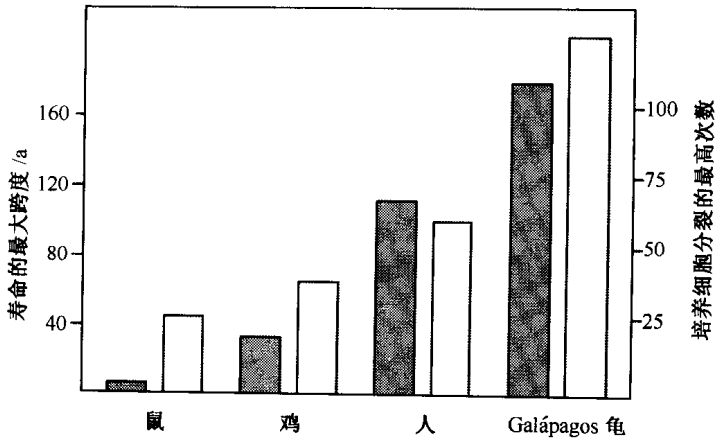


图 14-2　物种的寿命与体外培养时细胞传代次数的关系（引自 Kleinsmith *et al*., 1995）
长寿物种的细胞体外培养的代数比短寿物种的细胞代数多，表明细胞的衰老是由生物本身的程序决定的。灰色部分表示生物的寿命，白色部分部分表示体外培养传代的次数。

14.1.2.2　细胞的寿限

各类细胞本身的寿命很不一样，一般说来，能够保持持续分裂能力的细胞是不容易衰老的。分化程度高又不分裂的细胞寿命却是有限的。表 14-1 列出了成年小鼠各类细胞的寿命。

表 14-1　成年小鼠各类细胞的寿命

接近或等于动物自身寿命的细胞	缓慢更新（长于 30d，短于动物的平均寿命）的细胞	快速更新（少于 30d）的细胞
神经元	肾上腺皮质细胞	皮肤表皮细胞
肾上腺髓质细胞	肾皮质细胞	口腔和胃肠道上皮细胞
骨细胞	唾液腺细胞	红细胞和白细胞
肌细胞	胰脏腺泡细胞及胰岛细胞	角膜上皮细胞
胃酶原细胞	胃壁细胞	
脂肪细胞	肝细胞	
肾髓质细胞		

从表 14-1 可以看出，第一类细胞的寿命接近于动物的整体寿命，如神经元、脂肪细胞、肌细胞等。一般认为此类细胞在机体出生后，便不再分裂增生，数量也不会增加，只是随着机体的生长，体积可以增大；尔后随着机体的衰老，体积又行缩小，甚至死亡。因此，细胞数量

也随年龄的增大而逐渐减少。表现为机体失去皮下脂肪、肌肉松弛萎缩、脑功能衰退等。第二类是缓慢更新的细胞，其寿命比机体的寿命短，如肝细胞、胃壁细胞等。肝细胞通常不分裂，但终生保留分裂能力，例如部分切除肝后，剩余的肝细胞即能行旺盛的同步分裂。第三类是快速更新的细胞，如皮肤的表皮细胞、红细胞和白细胞等，它们在正常情况下终生保持分裂能力。机体中这3类寿命不同的细胞，分工合作，组成统一的整体。一般说来，某些细胞的大量死亡不至于使机体死亡，只有当与个体生命休戚相关的细胞如神经细胞、心肌细胞大量死亡时，才造成对生命的威胁。

14.1.3 细胞衰老的特征

细胞衰老过程是细胞生理与生化反应发生变化的过程，主要表现是细胞对环境变化适应能力和维持细胞内环境恒定能力的降低。细胞生理生化变化必然反映在细胞形态结构和功能上的变化。

14.1.3.1 细胞内水分减少

细胞到了衰老期，细胞内的生活物质逐渐减少，而原生质中出现一些非生命物质。另外，衰老细胞常发生水分减少的现象，结果使细胞收缩、体积缩小，失去正常的球形。

细胞内水分减少的原因可能是由于构成蛋白质亲水胶体系统的胶粒受时间或其他因素的影响，逐渐失去电荷而相互聚集；胶体失水，胶粒的分散度降低，不溶性蛋白质增多，导致细胞硬度增加，代谢速度减慢而趋于老化。

14.1.3.2 色素生成和色素颗粒沉积

许多细胞内色素的生成，随着衰老而增加。脂褐素也称老年色素，首先在衰老个体神经元的胞浆中被发现，它在分裂指数低或不分裂的细胞，如肝细胞、肌细胞和神经细胞中的积聚尤为明显。在人和大鼠的脑皮层和海马中脂褐素的积累是衰老的常见形态特征之一。

14.1.3.3 衰老过程中细胞质膜的变化

细胞质膜的流动性降低：随年龄的增大，膜结构中的磷脂含量逐渐下降，使质膜中胆固醇与磷脂的比值升高；但磷脂中不饱和脂肪酸含量及卵磷脂与鞘磷脂的比值却随年龄的增高而下降，使得细胞质膜的黏性增加，流动性降低。再加上质膜发生脂质过氧化反应，使细胞的兴奋性降低，离子转运的效率下降以及对内源性和外源性刺激的反应性也随之降低。

另外，衰老过程中细胞膜受体-配体复合物形成效率降低，大大影响了细胞的信号转导、细胞识别等基本的细胞反应。

14.1.3.4 衰老过程中线粒体的变化

有人认为线粒体是细胞衰老的生物钟。研究结果表明，细胞中线粒体的数量随着年龄的增大而减少，而其体积则随着年龄的增大而增大。膨大的线粒体中有时可以看到清晰的嵴，偶尔也会观察到线粒体内容物呈现网状化并形成多囊体以及外膜破坏、多囊体释出的情况。

与衰老关系紧密的是线粒体 DNA（mtDNA）突变。不少学者研究了 mtDNA 的变化，发现体细胞中 mtDNA 突变随年龄增大与衰老存在着直接正相关性，并证明与衰老相关的mtDNA突变主要是缺失突变。

14.1.3.5 细胞核的变化

细胞核结构在衰老变化中最明显的是核膜内折。在体内细胞中也观察到核膜的不同程度的内折，神经细胞尤其明显，这种内折随年龄增长而增加，最后可能导致核膜崩解。染色质固缩化是衰老细胞核中另一个重要变化。除培养细胞外，体内细胞，如老年果蝇的细胞等都可观察到染色质的固缩化。染色体端粒的缩短则是衰老细胞中最为显著的变化。

14.1.3.6 细胞骨架的变化

细胞骨架被认为是细胞代谢功能的调节者，尤其是微丝系统与细胞增殖和细胞分化的调节直接相关。细胞骨架的改变包括微丝系统的结构和成分发生变化和核骨架的变化。

14.1.3.7 蛋白质合成的变化

在细胞衰老过程中蛋白质合成速度降低，原因是由于核糖体的效率和准确性降低及蛋白质合成延伸因子的数量和活性降低所致。另外在细胞衰老过程中蛋白质合成发生变化的另一个特点是一些特异蛋白质的出现或原有蛋白质发生衰老有关的结构上的改变，如纤黏连蛋白通常是胞外基质的主要蛋白，但在衰老细胞中这种蛋白质大量合成，可能与细胞的纤维形成有关。此外，衰老细胞中胶原酶蛋白也大量合成。

14.1.4 细胞衰老的理论

半个世纪以来，科学家们致力于分析研究衰老发生的原因及导致衰老变化的机制，提出了众多有关衰老起因的观点或学说。如遗传程序论（genetic program theory）、体细胞突变论（somatic mutation theory）、错误成灾论（error catastrophe theory）、自由基理论（free radical theory）、线粒体损伤论（mitochondrial damage theory）等，近几年，又有衰老基因（senescence gene）和衰老相关基因（senescence-associated gene）的研究报道。由于衰老是一个十分复杂的生命现象，又受到多种因素包括环境因素和体内因素的影响，任一角度的阐述都难以使衰老机理得到圆满解释，因而目前仍未形成较为一致的论点。

虽然衰老的理论很多，但归纳起来主要分为两类：一类是基因程序衰老理论，另一类是损伤积累衰老理论。

14.1.4.1 衰老的基因程序理论

衰老的基因程序理论认为衰老是遗传上的程序性过程，衰老是受特定基因控制的。一切生理功能的启动和关闭都是按照一定程序进行的。有一个程序存在于生物体的基因组中，生物体的生长、发育、老化和死亡都由这一程序控制。这一理论有三方面的证据支持。首先是Hayflick 的细胞培养实验是这一理论的实验基础。另外，太平洋沿岸的马哈鱼也是这一理论

典型的生物体。这种鱼在迁徙到产卵地，产卵后几周就死亡了，这期间鱼的鼻、口、背和皮肤上出现明显的形态改变，这些变化使组织广泛退化。第二，发现人从30岁开始，人体各种器官的功能有1%的减退，这包括肺功能、心脏功能、肌功能和听力等。第三是早老症(symptom of early aging)也提供了一些少数基因影响和控制整个衰老过程的证据。如具有progeria症（一种早老症）的儿童很早就会脱发、满面皱纹、严重关节炎等，一个小孩看起来像是一位老者（图14-3）。

图14-3　早老症儿童与正常儿童的比较（引自Sarr，2000）
左边是一个正常健康的9岁儿童，右边是一个患早老症的8岁儿童。

也有很多例子不符合甚至反对基因程序论，最突出的例子是饮食对蜜蜂寿限的影响，蜂王可活6年之长，而工蜂只能活3～6个月。它们寿命的不同不是由于昆虫遗传基因不同，它们的基因组是相同的。寿命不同仅仅是因为在幼虫期是否喂食蜂王浆，蜂王浆可使蜜蜂的寿限提高大约20倍。

端粒缩短论和线粒体损伤论都支持衰老的基因程序论。

14.1.4.2　衰老的损伤积累理论

衰老的损伤积累理论认为，由于修复和维持总是少于无限存活的需求而出现的损伤积累。损伤的积累可以通过细胞成分的磨损和撕裂的方式或合成错误的方式出现。这些错误包括DNA复制错误、蛋白质合成错误。最有代表性的理论是错误成灾理论。它是指细胞大分子合成错误成灾。意思说，细胞里的核酸和蛋白质在生物合成中如果由于某些原因发生差错，当变质的非功能蛋白质达到一定水平时，出现完全丧失功能的“错误灾难”。这些差错会得到积累，并迅速扩大，引起代谢功能大幅度降低，导致衰老。从衰老的大鼠细胞中分离出了一些变质的非功能或活性很小的SOD。人类在60岁以后很容易得白内障，90%晶状体蛋白发生交联和聚合。在老年人红细胞中也分离出不正常蛋白。这可能不是由于转录和翻译错误造成的，有可能是修复功能下降使被损伤的蛋白质没有及时取代造成的。另一个原因可能是组织中水

解不正常蛋白质的能力随年龄增加而减小了。

14.1.4.3 细胞衰老的端粒假说

人类染色体末端普遍存在端粒结构，但各类细胞端粒长度各有差异，一般体细胞的端粒比生殖细胞短。人类染色体端粒是由 250～1500 个进化上高度保守的 TTAGGG 重复序列组成，是由端粒酶催化合成的。Harley 等发现人体内成纤维细胞端粒每年约缩短 14～18bp，而外周血淋巴细胞则每年缩短 33bp。正常人二倍体成纤维细胞在体外培养时随代数的增加，细胞中的端粒以一定速率缩短，DNA 每复制一次，端粒就缩短一段。人体血细胞与皮肤细胞端粒长度也随增龄而相应缩短。因此，端粒记录着细胞的年龄并预示它死亡的时限。精细胞和肿瘤细胞（如 HeLa 细胞）的端粒远较体细胞长，且很稳定，不会因年龄的增长而缩短。端粒的稳定性由端粒酶维持。精细胞和 HeLa 细胞含有较高的端粒酶活性，体细胞端粒酶活性极低，呈抑制状态。人体细胞端粒长度随年龄增加而缩短，但鼠的成纤维细胞则无增龄变化。因此端粒长度可能是人类种族特异性的衰老生物学标志。

Harley 于 1990 年提出细胞衰老端粒假说。他认为由于端粒酶的存在，生殖细胞的端粒相当稳定，不会衰老。高度分化的体细胞由于端粒酶活性处于抑制状态，细胞分裂时 DNA 不完全复制而引起端粒 DNA 的少量丢失，不能靠端粒酶补偿，所以随着细胞分裂次数的增加，端粒不断缩短。由于端粒的缩短，靠近染色体两端的基因就有可能随端粒的缩短而缺失，引发染色体畸变，使突变发生。当端粒缩短到一定程度（临界长度）时引发了 Hayflick 极限，细胞不再分裂。少数细胞由于端粒酶被激活，端粒获得修复，从而越过临危点成为永生化细胞。这一假说从一个侧面阐明衰老机制和癌变原理。

14.1.4.4 细胞衰老的线粒体损伤论

Cortopassi 和 Amteim 用聚合酶链式反应（PCR）法检查发现，成人心脏、肌肉和脑的线粒体有 DNA 片段低水平的丢失，胎脑和胎心则无此现象。目前，美、加、日等国多个实验室相继报道，衰老期间人体线粒体 DNA 出现异常，而且阿尔茨海默（Alzheimer）病脑组织线粒体中 DNA 损伤甚为多见。此外，老年糖尿病亦与线粒体 DNA 的损伤有关等。

人线粒体常见的 DNA 片段丢失为 5.0、7.0 和 3.6kb。线粒体 DNA 的片段丢失现象随增龄而增加，且男性高于女性。Cooper 等人测定 21 岁人骨骼肌线粒体基因组 5.0kb 片段（8470～13 477核苷酸之间）丢失率仅为十万分之一，78 岁时上升到五千分之一。此外，还发现在正常老年人心、血管组织中存在 7.4kb 片段（8649～16 084核苷酸间）的丢失，其丢失频率随增龄而增加。

研究发现老龄人各种 mtDNA 缺失突变存在突变“热点”，即缺失突变的缺失片段 5′端和 3′端断裂位点的侧翼具有 4～13bp 同向重复序列，如 5kb 常见缺失的侧翼为 13pb 的 5′端 ACCTCCCTCACCA 重复序列。动物实验也证实线粒体 DNA 有随年龄增加，其丢失频率升高现象。

实际上，mtDNA 的损伤缺失与自由基有极大的关系，mtDNA 是细胞中活性氧等自由基损伤的敏感标靶。

14.1.4.5 自由基理论

自由基及其性质

自由基（free radical）是指那些在原子核外层轨道上具有不成对电子的分子或原子基团。所谓未成对电子，就是指那些在原子或分子轨道中未与其他电子配对而独占一个轨道的电子。如AB两个原子各提供一个电子通过共价键形成一个分子A:B，这两个电子是配对的。如果在化学反应中发生了均裂，A和B各带走一个电子，它们就是未成对电子，A·和·B就称为自由基。

$$A{:}B \rightarrow A\cdot + \cdot B$$

书写上用一个中圆点标在自由基的结构或分子式上，表明自由基中的未成对电子如氯原子自由基·Cl 、甲基自由基·CH_3。

自由基的种类很多，活性最强的就是氧中心自由基，简称氧自由基，包括·O_2（超氧自由基）、·OH（羟自由基）和 H_2O_2。

在正常条件下，自由基是在机体代谢过程中产生的。此外，空气污染、辐射、某些化学物质等都可影响自由基的产生。具有自由基的是一类高度活化的分子。当这种分子与其他物质反应时，力图得到电子，而对细胞及组织产生十分有害的生物效应。

自由基对生物大分子的损伤

自由基由于活性强，容易与细胞内的生物大分子发生反应，这种反应是掠夺式的，使生物大分子发生伤害。①自由基与核酸分子中的碱基发生加成反应，OH·等加到碱基（胸腺嘧啶 C_6 或 C_5、腺嘌呤 C_8）的双链上，破坏碱基可产生基因突变。②自由基可加成到膜脂及其他脂类不饱和脂肪酸的双链中，引起脂质过氧化，并可产生新的自由基。如脂质过氧化可使线粒体损伤，导致能量代谢障碍；微粒体损伤，使多聚核糖体解聚，抑制蛋白质合成；溶酶体损伤可使溶酶体膜通透性改变，使机体受到更大损伤。③自由基常攻击肽链上的脯氨酸残基，引入羰基而生成α-吡咯烷酮，经水解与其相邻氨基酸断开，造成蛋白质断裂。此外自由基还引起蛋白质交联、蛋白质残基侧链基发生改变、破坏蛋白质高级结构等。④自由基的氧化损伤涉及细胞骨架蛋白。如肌动蛋白是构成微丝的主要蛋白质。用肌动蛋白做实验，发现它的4个—SH为氧化过程的靶子，肌动蛋白与氧化型谷胱甘肽（GSSG）之间形成二硫键可导致分子表面电荷的改变；在老化的红细胞中也可检测出类似的修饰物，用醌处理的细胞中也发现不同肌动蛋白分子或肌动蛋白与其他蛋白质之间形成二硫键（图14-4），这种氧化性蛋白质

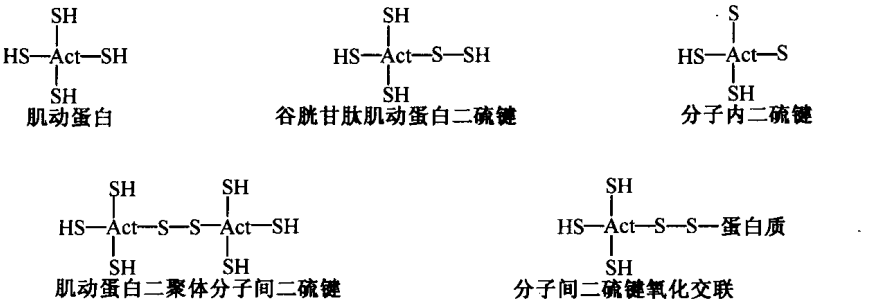


图14-4 细胞骨架肌动蛋白中巯基氧化的机制

交联引起大分子的聚集。

衰老的自由基学说

衰老的自由基学说是美国科学家 Harman 1955 年在美国的原子能委员会提出的，题目是“衰老：根据自由基和放射化学提出的理论”，该理论于 1955 年 7 月 14 日首先刊载在内部刊物加利福尼亚大学放射实验室工作报告上，随后于 1956 年在老年医学杂志上正式公开发表。

这一学说是建立在实验研究的基础上：以实验动物的寿命作为整体实验的标记物，用饮食技巧来研究自由基与衰老的两个方面，一方面在饮食中减少某种可以提高自由基水平的化合物，如减少铜离子或不饱和价键的化合物，从而减少自由基反应对机体的损伤。另一方面，加入某些抗氧化剂，可以抑制自由基反应，清除自由基。如 2-巯基乙胺（2-MEA）、α-生育酚。结果表明：饲料中添加抗氧化剂可提高小鼠、大鼠、果蝇、线虫的寿命。如：将质量百分比浓度为 1.0% 的 2-MEA 加到雄性 LAFl 小鼠的饲料中，在断奶后很短时间开始喂小鼠可平均提高寿命 30%，相当于人的平均寿命从 73 岁提高到 95 岁。

衰老的自由基学说的核心内容有 3 条：①衰老是由自由基对细胞成分的有害进攻造成的；②这里所说的自由基，主要就是氧自由基，因此衰老的自由基理论，其实质就是衰老的氧自由基理论；③维持体内适当水平的抗氧化剂和自由基清除剂水平可以延长寿命和推迟衰老。

机体内存在着自由基清除系统，其可以最大限度地防御自由基的损伤。自由基清除系统包括酶促反应和非酶促反应两部分。酶促反应所需酶有谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-PX）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、过氧化物酶（PXP）及过氧化氢酶（catalase，CAT）。非酶促反应的作用物质主要为一些低分子的化合物，是一些抗氧化作用的物质，统称抗氧化剂（antioxidant），主要有谷胱甘肽（GSH）、维生素 C、β-胡萝卜素、维生素 E、半胱氨酸、硒化物、巯基乙醇等。此外，细胞内部形成的自然隔离，也能使自由基局限在特定部位，如氧化反应产生的自由基主要在线粒体内，线粒体作为独立的细胞器可很大限度地阻止自由基的扩散。

图 14-5　老年斑：自由基攻击细胞的证据（引自 Starr *et al*.，2000）

儿童细胞中合成的超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的数量多，可有效清除细胞氧自由基，老年人合成蛋白质的功能下降，超氧化物歧化酶和过氧化氢酶浓度减少，清除自由基能力低，皮肤上老年斑是自由基对细胞攻击的证据。

随着增龄，细胞合成蛋白质的能力下降，也包括超氧化物歧化酶和过氧化氢酶合成数量的减少或合成了没有功能的超氧化物歧化酶和过氧化氢酶，自由基和过氧化氢就会积累，并且对细胞的蛋白质、DNA、细胞膜等进行攻击破坏；细胞在自由基的攻击下会死亡，这样，就会在老人的皮肤上见到老年斑（age spot），它是自由基对细胞破坏的见证(图 14-5)。

由此可见，细胞中的自由基若不能及时清除，则过多的自由基会对许多细胞组分造成损伤。它们能使质膜中的不饱和脂肪酸氧化，从而使膜内酶活性破坏、膜蛋白变性、膜脆性增加、膜结构发生改变，因而膜的运输功能紊乱以至丧失；它们还能将蛋白质中的巯基氧化而造成蛋白质发生交联、变性，使酶失活；另外它们还能使 DNA 链断裂、交联、碱基羟基化、碱基切除等，从而对 DNA 造成损伤。有人认为在衰老的原因中，99%是由自由基造成的。

由于维生素 E、维生素 C 等具有清除自由基的作用，所以适当补充这些物质能够弥补体内合成超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的不足，达到延缓衰老的目的。

细胞生长能力的减退是衰老的重要表现。细胞衰老现象，可延缓，但不能逆转。衰老细胞停止于细胞周期的 G_1 期，不能进入 S 期。细胞在体外培养时，不增殖的衰老细胞比例逐渐上升，最后所有的细胞都成为衰老细胞。体外培养的细胞在衰老后，并不立即死亡，如定期更换培养液，停止增殖的衰老细胞仍可维持生存。

14.2 细胞死亡

细胞死亡（cell death）的一般定义是细胞生命现象不可逆的停止。细胞死亡有两种形式：一种为坏死（necrosis）性死亡，是由外部的化学、物理或生物因素的侵袭而造成的细胞崩溃裂解；另一种为程序性死亡，是细胞在一定的生理或病理条件下按照自身的程序结束其生存。多细胞生物随时都在进行着有规律的程序性细胞死亡，如人类的淋巴细胞系统、神经系统等。

可通过活体染色来判断细胞是否死亡，常用的方法是以中性红或台酚蓝染色。中性红染色时活细胞染成红色，死细胞不着色；台酚蓝则相反，染成蓝色的是死细胞，不着色而透明的是活细胞。除了形态学特征外，更重要的是根据细胞是否具有生活力，主要是细胞的繁殖能力来判断。单细胞生物的细胞死亡，即是个体的死亡，而多细胞生物个体死亡时，并非机体的所有细胞都立即停止生命活动。所以对多细胞个体死亡的判断，不能简单的以心脏停止跳动作标准，而是以脑神经是否死亡来判断。

14.2.1 多细胞有机体中细胞数量和质量的控制

在多细胞生物体中，细胞分化发育到一定的阶段，细胞的数量要控制在一定的水平，不能让其无限的分裂和增殖。不同的生物控制的细胞数量水平是不同的，如一个受精的老鼠的卵细胞和一个受精的人的卵细胞在体积上大小相似，但是成年的老鼠比成年的人要小得多，这主要是细胞数量的差别：成年人体的细胞数量比成年鼠的细胞数量多得多。那么是什么原因控制着这种数量的差异？这主要是细胞的增殖、细胞的存活寿命和细胞的死亡这三者间有着严格的调控机制。另外，多细胞个体不仅控制着细胞数量，也要控制细胞的质量，特别是对那些与个体同寿的细胞质量更要严格控制。另外，即使在同一个体内，有些组织和器官体

积大，有些体积较小。如是什么控制大象的鼻子长得很长？答案是不清楚的，但可以推测，多细胞有机体通过信号调节细胞的数量和质量。

14.2.1.1 信号控制细胞的增殖

单细胞的生物如细菌和酵母都是尽可能快地生长和分裂，它们的增殖速率依周围环境中的营养而定。而多细胞的生物体中的细胞是高度组织化的，因此细胞的增殖必须靠信号行事，需要补充细胞数量时，由特定的组织发出指令。因此，对于动物细胞的增殖仅有营养是不够的，还必须有信号，这种信号通常来自邻近细胞。由信号决定细胞是进行增殖还是停止进入细胞周期。

成视网膜细胞瘤蛋白（retinoblastoma protein，RB protein）对细胞周期的控制是通过信号控制细胞增殖的典型例子。RB 蛋白是在患有成视网膜细胞瘤的儿童眼组织中鉴定到的，这种病极少遗传，而且在儿童中的发病率也极低。*RB* 基因的丢失或缺陷不仅会导致成视网膜细胞瘤，同时也与人类其他的肿瘤相关联，因此，RB 蛋白是抑癌基因的原型蛋白。

在脊椎动物的细胞核中 RB 蛋白很丰富，它通过与一些基因的调节蛋白相结合，以此阻止与细胞分裂相关基因的转录，进行细胞周期的调节（图 14-6）。

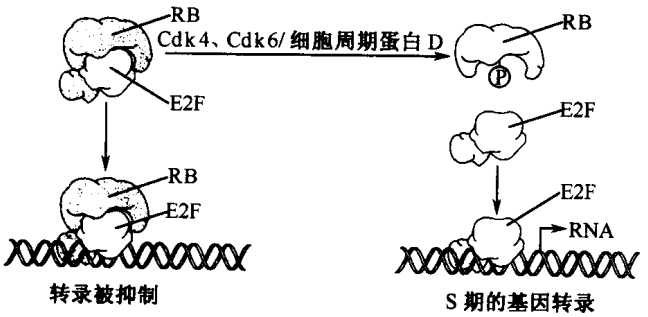


图 14-6 RB 蛋白对细胞周期的调节（引自 Cooper，2000）

RB 蛋白的活性受磷酸化调节。RB 蛋白未被磷酸化时，与 E2F 家族的成员结合，抑制由 E2F 调节的基因转录，从而抑制了 S 期所需的多种蛋白质的合成。RB 蛋白被 G_1 期后期的 Cdk4、Cdk6/细胞周期蛋白 D 复合物磷酸化后，改变了 RB 蛋白的构型从而释放所结合的转录因子 E2F，解除了抑制的 E2F 促进靶基因的转录，合成 S 期活性蛋白，使细胞得以从 G_1 期进入 S 期。

受转录因子 E2F 调节的基因与细胞周期相关，其中包括细胞周期蛋白 E、DNA 聚合酶 α。无论细胞中有没有 RB 蛋白的存在，转录因子 E2F 都与靶序列结合。由于 RB 蛋白是一种抑制蛋白，所以 RB/E2F 复合物就抑制了 E2F 所调节的基因表达。实际上，RB 蛋白作为分子开关，控制着 E2F 的作用。

一些细胞外刺激细胞增殖的信号如生长因子等能够作为 G_1 细胞周期蛋白-Cdk 复合物的激活信号，从而使 RB 蛋白磷酸化。从这个意义上说，RB 蛋白只是一把打开细胞周期开关的钥匙，控制钥匙的是信号分子：生长因子。

在该途径中，第一个被鉴定的信号分子是血小板衍生生长因子（PDGF），它通过与细胞

质膜中的受体结合，激活细胞内的信号转导途径。该信号途径引起的细胞增殖主要是通过细胞分裂进行伤口的愈合，用新生成的细胞取代坏死的细胞。其机制是：当形成血块时，血块中血小板被触发释放 PDGF，释放出的 PDGF 与伤口处的活细胞质膜中酪氨酸蛋白激酶受体结合，引起细胞的增殖分裂，对伤口进行愈合。在肝细胞中也有类似的细胞增殖，不过，触发的信号分子是肝细胞生长因子。

大多数体外培养的动物细胞都需要一些特别的生长因子促使细胞的分裂和增殖。这些生长因子主要是选择性的调控某些与分裂增殖有关基因的表达，进行细胞分裂的控制。表 14-2 列出一些常见的生长因子以及它们的作用。

表 14-2　某些生长因子和它们的作用

生长因子	功　能*
血小板衍生生长因子（PDGF）	激活结缔组织细胞增殖
表皮生长因子（EGF）	激活皮肤组织细胞增殖
成纤维细胞生长因子（FGF）	激活成纤维细胞增殖
肝细胞生长因子（HGF）	激活肝细胞增殖
红细胞生成素（EPO）	激活红细胞的增殖、分化和发育

* 表中除红细胞生成素外，其他生长因子都能激活多种类型细胞的增殖。

14.2.1.2　Cdk 抑制蛋白控制细胞增殖的质量

由于细胞的 DNA 易受各种理化因素的影响造成损伤，如果具有损伤的 DNA 也进入细胞周期，就会产生一个有损伤甚至有缺陷的细胞。在细胞周期的各阶段都有严格的自我调节机制。例如 DNA 在复制过程中受到损伤，细胞就会被阻止在 S 期，不能进入 G_2 期。那么是什么原因将细胞阻止在某一个时期呢？其详细机制还不太了解。研究发现，CDK 抑制蛋白（CDK inhibitor protein）在控制细胞增殖质量中起重要作用，这些抑制蛋白可以阻止 CDK 的装配或抑制 CDK 的活性。例如当 DNA 在 S 期受到损伤时可激活肿瘤抑制基因 *P53* 的产物 P53 蛋白，P53 蛋白进一步激活 CDK 抑制蛋白基因 *P21* 的转录和表达，合成的 P21 蛋白抑制 S 期细胞周期蛋白-CDK 复合物的活性，一直等待受损伤的 DNA 修复和正确复制之后才进入 G_2 期。

其实，动物细胞不仅增殖需要信号，是继续生存还是进入死亡也都是由信号决定的。如果细胞失去了生存因子（survival factor），就要进入程序性死亡。

14.2.2　程序性细胞死亡及其特性

程序性细胞死亡（programmed cell death，PCD）又称细胞凋亡（apoptosis）。程序性细胞死亡是指为维持内环境稳定，由基因控制的细胞自主的有序性的死亡，它涉及一系列基因的激活、表达以及调控等的作用，因而具有生理性和选择性。

apoptosis 的概念源自于希腊语，原意是指树叶或花的自然凋落；而细胞发生程序性死亡时，就像树叶或花的自然凋落一样，凋亡的细胞散在于正常组织细胞中，无炎症反应，不遗

留疤痕。死亡的细胞碎片很快被巨噬细胞或邻近细胞清除，不影响其他细胞的正常功能。

14.2.2.1 细胞坏死与程序性细胞死亡

细胞坏死与细胞程序性死亡是两种完全不同的过程和生物学现象，在形态学、生化代谢改变、分子机制、细胞的结局和意义等方面都有本质的区别（图 14-7）。

细胞坏死是因病理而产生的被动死亡，而程序性细胞死亡是细胞接受指令后的主动死亡，属于“安乐死”。程序性细胞死亡是由它的生存环境、自身的代谢状况、发育史以及基因组等因素触发的，并且是受高度程序性控制的。

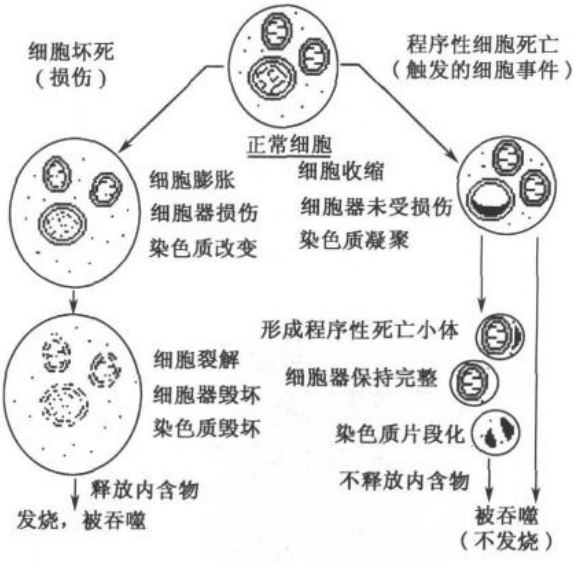


图 14-7 细胞的两种死亡方式及其比较
（引自 Alberts *et al*., 1998）

程序性细胞死亡与细胞坏死有 3 个根本的区别。首先是引起死亡的原因不同：如物理性或化学性的损害因子及缺氧与营养不良等均导致细胞坏死，而程序性细胞死亡则是由基因控制的；第二是死亡的过程不同，坏死细胞的质膜通透性增高，致使细胞肿胀，细胞器变形或肿大，早期核无明显形态学变化，最后细胞破裂；而程序性细胞死亡的细胞不会膨胀、破裂，而是收缩并被割裂成膜性小泡后被吞噬；第三是坏死的细胞裂解要释放出内含物，并常引起炎症反应；在愈合过程中常伴随组织器官的纤维化，形成疤痕。而程序性细胞死亡的细胞没有被完全裂解，所以不会引起炎症。

14.2.2.2 程序性细胞死亡的特征

程序性细胞死亡具有明显的形态学特征，包括细胞变圆，染色质凝聚、分块，胞质皱缩（图 14-8）。

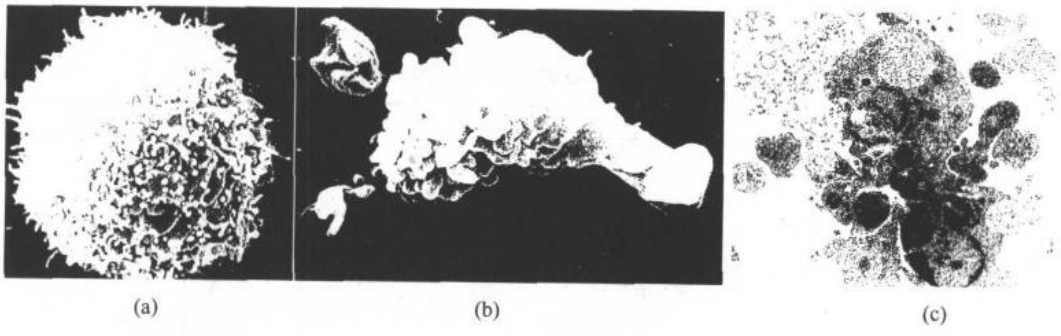


图 14-8 正常的细胞与程序性死亡细胞形态比较（引自 Karp, 1999）
（a）扫描电镜观察的正常 T 细胞；（b）扫描电镜观察的程序性细胞死亡的 T 细胞的形态，表面可见许多芽；（c）用抑制剂处理的正处于膜起泡阶段（membrane blebbing stage）的程序性死亡细胞的透射电镜照片。

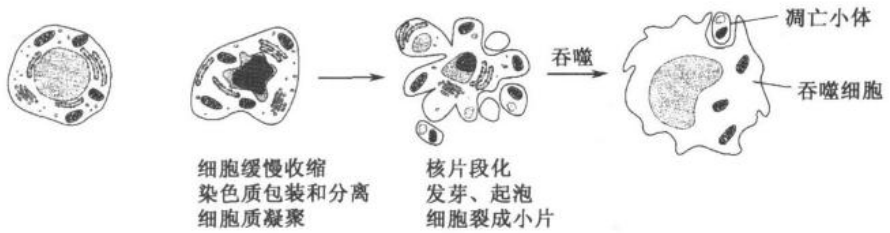


图 14-9　程序性死亡细胞的形态结构变化（引自 Karp，1999）

程序性死亡细胞的核 DNA 在核小体连接处断裂成核小体片段，并向核膜下或中央异染色质区凝聚形成浓缩的染色质块，在电镜下呈高电子密度。随着染色质不断凝聚，核纤层断裂消失，核膜在核孔处断裂形成核碎片。同时在程序性细胞死亡过程中，由于不断脱水，细胞质不断浓缩，细胞体积减小。凋亡细胞的核经核碎裂形成染色质块（核碎片），然后整个细胞通过发芽、起泡等方式形成一些球形的突起，并在其基部绞断而脱落产生大小不等内含胞质、细胞器及核碎片的凋亡小体（apoptotic body）；或通过分隔机制：在凋亡细胞内由内质网分隔成大小不等的分隔区，靠近细胞膜端的分隔膜与细胞核融合并脱落形成凋亡小体。最后，凋亡小体被周围细胞或单核细胞吞噬（图 14-9）。

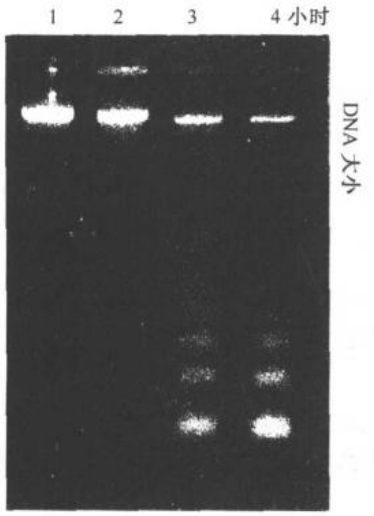


图 14-10　程序性细胞死亡细胞的 DNA 梯状谱型（引自 Lewin，2000）

程序性细胞死亡最突出的生化特征是染色质 DNA 的有控裂解，并且是由于内源性内切核酸酶基因的活化和表达而造成的结果。这种由内源性内切核酸酶切割的染色质 DNA 片段大小是有规律的，即都为 200bp 的倍数。因此，抽提其中的 DNA，进行琼脂糖凝胶电泳时，或进行氯化铯溴化乙锭超速离心时，呈现出梯状（ladder）谱型（图 4-10），可作为鉴别是否发生程序性细胞死亡的一个重要的生化标志。

由上述可见，程序性细胞死亡与细胞坏死在形态学、生化反应的改变、分子机制、细胞结局等方面都有本质的区别（表 14-3）。

表 14-3　程序性细胞死亡与细胞坏死的比较

比较内容	程序性细胞死亡	细胞坏死
质膜	不破裂	发生破裂
细胞核	固缩，DNA 片段化	弥漫性降解
细胞质	由质膜包围形成凋亡小体	溢出，细胞破裂成碎片
细胞质生化改变	溶酶体的酶增多	溶酶体解体
蛋白质合成	有	无
基因活动	有基因调控	无基因调控
自吞噬	常见	缺少
线粒体	自身吞噬	肿胀
诱发因素	生理性信号	强烈刺激信号
对个体影响	生长、发育、生存所必需	引起炎症

14.2.3 程序性细胞死亡的机理

2002 年的诺贝尔生理学和医学奖授予了在器官发育和程序性细胞死亡研究领域中做出奠基性贡献的 3 位科学家：英国的 Brenner、Sulston 和美国的 Horvitz。他们创造性地用线虫作为实验模型，实现了对器官发育过程中细胞分裂、分化的原位观察，完成了细胞图谱的绘制，在此基础上发现并研究了调控器官发育程序性细胞死亡的关键基因及其功能并进一步在高等哺乳动物中发现了相关功能基因。

程序性细胞死亡是基因调控作用的结果。有很多基因参与调控程序性细胞死亡过程，调控环节包括信号转导、基因表达、蛋白质生物合成和代谢过程等。这些基因也叫程序性细胞死亡相关基因，大致可分两类：一类叫程序性细胞死亡遗传学相关基因，主要获自线虫，与线虫中 131 个细胞的程序性死亡的遗传控制有关，包括 *ced -1* ～ *ced -9*，*nuc -1*、*ces -1*、*ces -2* 和 *egl -1*；另一类主要针对哺乳类细胞，包括原癌基因、肿瘤抑制基因和病毒癌基因，如*bcl -2* 家族、c-*myc*、*P53*、*Ela* 和 *Elb* 等。也可将上述相关基因分为另外两种类型：其表达可促进程序性细胞死亡者和可抑制程序性细胞死亡者，前者包括 *ces -2*、*ced -3*、*ced -4*、*P53*、c-*myc*、*Ela*、*ICE*、*TNF -α*、*APO -1/fos* 等，后者包括 *egl -1*、*ces -1*、*ced -9*、*bcl -2*、*Elb*、*EBV -LMP -1*、*BHRF -1*、*crmA*、*A -20* 等。

14.2.3.1 程序性细胞死亡的过程

健康细胞决定进入程序性细胞死亡是由信号决定的，这种信号既可是细胞外的也可是细胞内的。程序性细胞死亡分为两个阶段：一是死亡激活期（activation phase），此阶段主要是接受来自内部或外部的死亡信号（death signal）并作出反应，即接受指令并决定死亡。第二阶段是死亡执行期（execution phase），即执行一套死亡程序，包括发生染色质凝聚，并逐步分布在核膜周围；接着发生细胞质浓缩，此时桥粒和中间纤维的连接被破坏，膜泡形成凋亡小体，最后被吞噬细胞吞噬和降解等。程序性死亡的细胞之所以能够被吞噬细胞识别和吞噬，是因为这些细胞的表面具有“将我吃掉”的信号，这种信号在正常细胞的表面是不存在的。研究得最清楚的被吞噬信号是存在于程序性死亡细胞质膜脂双层外叶的磷脂酰丝氨酸（phosphatidylserine）分子，它一般存在于正常细胞质膜脂双层的内叶。

14.2.3.2 秀丽新小杆线虫中参与程序性细胞死亡控制的基因

关于程序性细胞死亡的分子基础研究最初是在秀丽新小杆线虫（*Caenorhabditis elegans*，CE）中获得突破。在胚胎发育期间，秀丽新小杆线虫有 1 090 个体细胞，但在发育过程中有

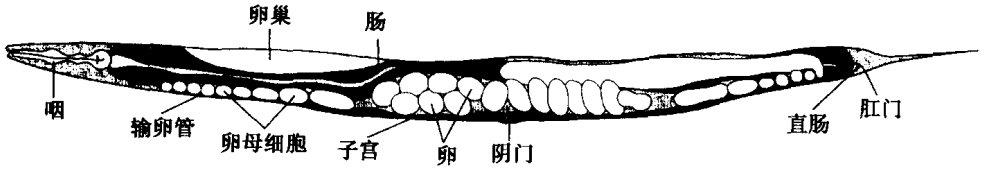


图 14-11 雌雄同体的秀丽新小杆线虫（引自 Hartl，1991）

131 个细胞死亡。因此，一个成熟的秀丽新小杆线虫有 959 个体细胞和约 1 000～2 000 个性细胞。线虫的成虫分雌雄同体和雄性两种性别，雌雄同体相当于雌性（图 14-11）。虫体透明，有 6 对染色体，约 3 000 个基因。

秀丽新小杆线虫的细胞死亡是一种典型的程序性细胞死亡。15 个基因分别在不同程度上与 CE 的 PCD 有关。根据其作用不同大致可分为 4 组。第 1 组含同 PCD 有关的决定死亡的两个基因，即 *ces -1*（ces 表示 CE 细胞存活的调控基因）和 *ces -2* 基因，即该组基因在线虫 CE 的 PCD 调控具有重要意义：第 2 组含有执行死亡的 4 个基因：*ced -3*、*ced -4*、*ced -9* 和 *egl -1* 基因。第 3 组含有 7 个与死亡细胞被吞噬细胞所吞噬的基因，即 *ced -1*、*ced -2*、*ced -5*、*ced -6*、*ced -7*、*ced -10* 和 *ced -11*。第 4 组是死亡细胞在吞噬体中被降解的基因，如核酸酶基因 1，即 *nuc -1* 基因，如果 *nuc -1* 发生突变，则 DNA 裂解受阻，但不能抑制细胞死亡，表明此核酸酶并非 PCD 所必需。由这 4 组基因共同作用导致线虫细胞的程序性死亡（图 14-12）。

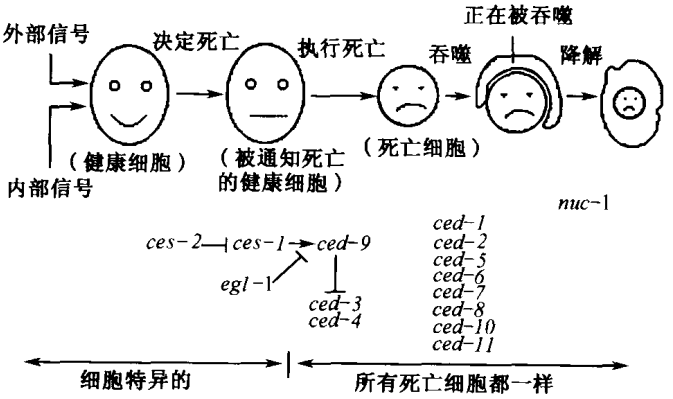


图 14-12　秀丽新小杆线虫程序性细胞死亡途径及相关基因（引自 Alberts *et al*., 1998）

ced -3、*ced -4*、*ced -9* 和 *egl -1* 4 个基因构成了线虫执行死亡的“死亡机器”（death machinery）。遗传学研究发现 *ced -3* 和 *ced -4* 是细胞杀手，在 *ced -3* 或 *ced -4* 突变体中，雌雄同体发育中应该死去的 131 个细胞都活下来了；*ced -9* 可抵消 *ced -3* 和 *ced -4* 的作用，防止细胞被杀死，因此是存活因子，在 *ced -3* 和 *ced -4* 的杀死细胞作用中起负调控。

进一步的研究发现真正的细胞杀手是 *ced -3* 而不是 *ced -4*。*ced -3* 编码的蛋白与哺乳动物中的白细胞介素- 1β 被覆酶［interleukin-1β（IL-1β）-coverting enzyme，ICE］相类似。ICE 属于日益扩大的半胱氨酸蛋白酶家族，该家族至少有 30 个成员，统称为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶。*ced -4* 的作用是转换器（adapter），对 *ced-3* 引起的程序性细胞死亡起促进作用。

14.2.3.3　动物细胞中蛋白质酶解级联系统对程序性细胞死亡的介导

所有的动物细胞都有一种相类似的控制程序性细胞死亡的机制，即通过一个自杀性蛋白酶家族的介导，这种蛋白酶在诱导程序性死亡信号的作用下通过自我切割而激活。激活的自杀性蛋白酶又可激活家族中的其他成员，引起蛋白质酶解的级联反应。在该反应系统中，上一级的信号激活下一级的一个关键蛋白，并快速将其水解，从而使信号得以放大（图 14-13）。最后，被激活的蛋白酶切割了细胞与程序性细胞死亡相关的关键蛋白，如核纤层蛋白，从而快速引起有控制的细胞死亡。

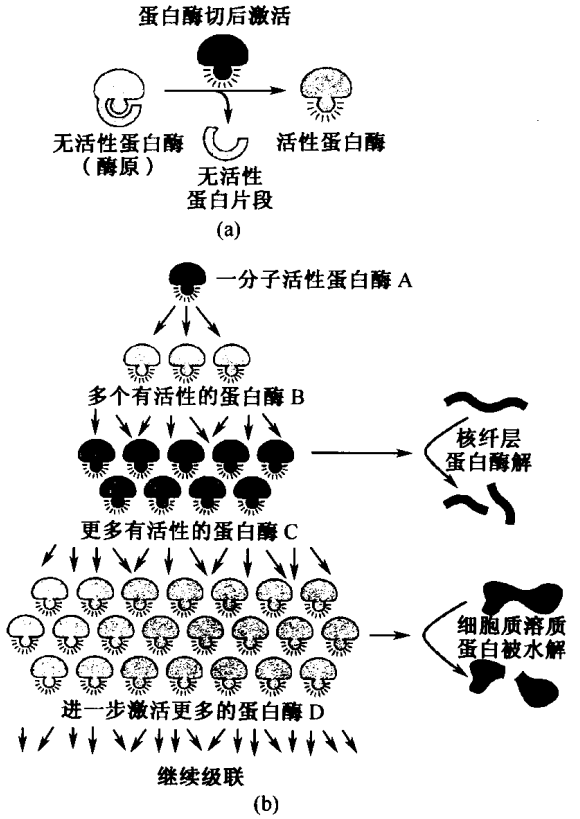


图 14-13　蛋白酶解级联反应介导的程序性细胞死亡（引自 Alberts *et al*., 1998）

(a) 每一个自杀性的蛋白酶以非活性的形式存在，它可以被同一蛋白酶家族中的另一个成员裂解切割而自我激活。(b) 每一被激活的蛋白酶分子能够切割许多蛋白酶分子，并将它们激活。以这种方式，开始激活的少量蛋白酶通过激活的级联反应，激活大量的蛋白酶。某些被激活的蛋白酶能够切割细胞内一些关键的蛋白，如核纤层蛋白，导致细胞有控制的死亡。

14.2.3.4　天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶

上述级联反应中的自杀性蛋白水解酶是天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶（cysteine-containing aspartate-specific protease），简称 caspase。由于 caspase 家族的成员较多，它们作用时分成一些亚组被激活，每一组 caspase 对应不同的激活信号。如 caspase-3、6、7 和 8 在 FAS/TNF 介导的程序性细胞死亡途径中起作用；而 caspase-9 和 3 一起参与线粒体中 Apaf-I、细胞色素 *c* 介导的程序性细胞死亡。在人类，已经鉴定了 10 种不同的 caspase。

各种 caspase 都富含半胱氨酸，它们被激活后，能够在靶蛋白的特异天冬氨酸残基部位进行切割。在正常的细胞内，每一种 caspase 都是以非活性状态存在的，这种非活性的 caspase 称作酶原（zymogen），它是酶的非活性前体，其肽链比有活性时长一些，将多出的部分切除，就转变成有活性的 caspase。

有两类 caspase，一类是起始者（initiator），另一类是执行者（executioner），它们是如何协同引起级联反应？目前还不清楚。有一种看法认为，起始 caspase 在外来蛋白信号的作用下被切割激活，激活的起始 caspase 对执行者 caspase 进行切割并使之激活，被激活执行者 caspase 通过对 caspase 靶蛋白的水解，导致程序性细胞死亡（图 11-14）。

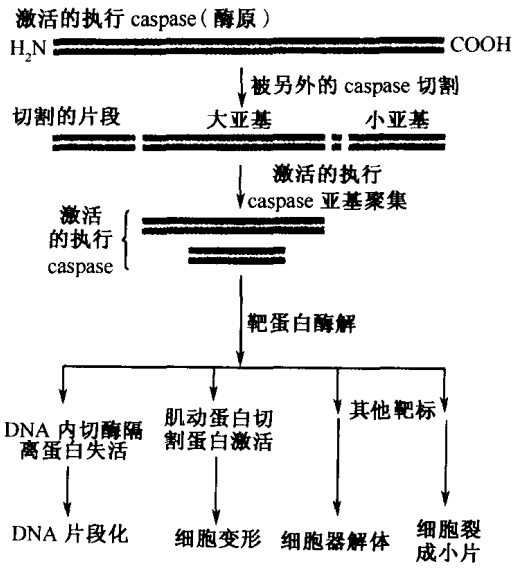


图 14-14　执行者 caspase 在程序性细胞死亡中的作用（引自 Griffiths，1999）

一种 caspase 激活的级联反应导致执行者 caspase 的激活。非活性的执行者 caspase（酶原）被激活的 caspase 切割，形成几种蛋白片段。其中两个大片段作为执行者 caspase 的两个亚基相互结合形成有活性的执行者 caspase，然后通过对一系列靶蛋白的切割（均在天冬氨酸残基 caspase 位点），导致细胞的程序性死亡。

研究表明，能够被 caspase 切割的靶蛋白包括以下几类。

（1）蛋白激酶。caspase 能够切割十多种蛋白激酶，如黏着斑激酶（focal adhesion kinase，FAK）、PKB、PKC 以及 Raf1。如果黏着斑激酶被破坏了，即破坏了细胞的黏着，使得细胞与相邻细胞失去黏着而导致程序性死亡。

（2）核纤层蛋白。核纤层蛋白是位于细胞核内膜下的一层纤维结构，对内膜具有支撑作用。核纤层蛋白被切割，导致核纤层解体、核被膜浓缩。

（3）细胞结构蛋白。一些维持细胞结构必需的蛋白质，如中间纤维、肌动蛋白和凝溶胶蛋白（gelsolin）等被 caspase 切割后导致细胞形态的改变。

（4）与 DNA 修复相关的酶类。由于 DNA 的修复是维持细胞内环境稳定的主要因素，如果这些酶类被 caspase 切割，合成的 DNA 难以保证正确，因而导致程序性细胞死亡。

（5）caspase 激活的 DNase 抑制蛋白。caspase 能够将 caspase 激活的 DNase 抑制蛋白水解，导致 DNase 被激活。DNase 是一种内切核酸酶，被激活后从细胞质转移到细胞核，与核 DNA 结合并将 DNA 切割成片段。

14.2.3.5　细胞外信号对程序性细胞死亡的激发

自杀性死亡途径的信号来自相邻细胞。如果细胞外的信号促进程序性细胞死亡，则属于死亡的正控制，这种例子很多，也研究得较为清楚。若细胞外信号抑制细胞的程序性死亡，则是死亡的负控制，将这种信号称为生存因子（survival factor）。目前对生存因子是如何作用的，基本不了解。

图 14-15 显示了细胞外信号——肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）激发细胞的程序性死亡的过程。顾名思义，TNF 是一种能够杀死肿瘤的因子，是由免疫系统的细胞合成的。TNF 的受体 TNFR1 是介导细胞程序性死亡的死亡受体（death

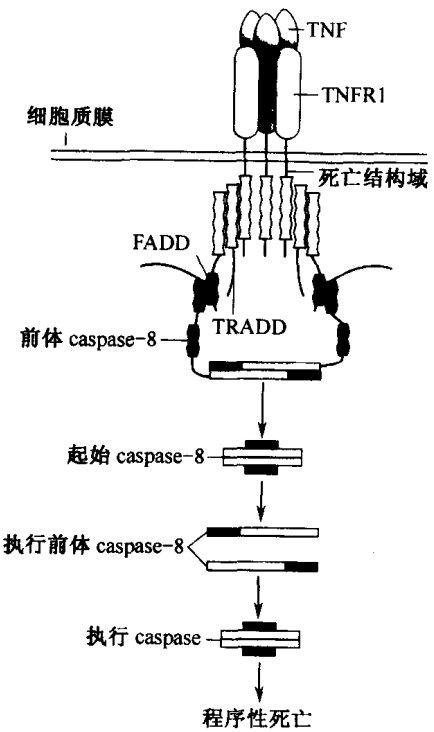


图 14-15　受体介导的程序性细胞死亡途径（引自 Karp，1999）

receptor）家族的成员，是由 3 个亚基装配而成的膜蛋白。受体的每一个亚基都含有一段由 70～80 个氨基酸残基组成的跨膜死亡结构域（death domain）。TNF 与受体结合，引起受体死亡结构域构型的改变，招募了许多细胞质蛋白与之结合，如 FADD（Fas-associated death domain）、TRADD（TNF receptor-associated death domain）和前体 caspase-8，这些蛋白质都具有死亡结构域。在前体 caspase-8 相互结合前，它们的酶活性很低，但当两个或多个前体 caspase 相互结合在一起时就进行相互切割并被激活。最后激活的起始 caspase-8 含有四条多肽链，是由两个前体切割后装配而成的。激活的起始 caspase-8 作用于执行前体 caspase，并将之激活，引起细胞的程序性死亡。

14.2.3.6 细胞内信号对程序性细胞死亡的激发

除了外部信号激发程序性细胞死亡外，细胞内源信号也会激发细胞的程序性死亡，包括：DNA 损伤、细胞质中 Ca^{2+} 浓度过高、极度氧胁迫（产生大量的自由基）等。在内源信号中有些是促进细胞死亡的正控制信号，如细胞色素 *c*，凋亡蛋白酶激活因子（apoptotic protease-activating factor，Apaf）。内源信号中也有抑制细胞死亡的负控制信号，如哺乳动物中的 BCL-2 和 BCL-x 蛋白。BCL-2 蛋白是一个特别的家族，家族中的有些成员促进凋亡，如 BAD、BID 、BAX，有些成员阻止细胞凋亡，如 BCL-2、BCL-x、BCL-w。BCL-2 能够阻止细胞色素 *c* 从线粒体释放到细胞质，从而抑制细胞凋亡。

图 14-16 是细胞内源信号激发细胞程序性死亡的过程。由于细胞内的损伤等信号激活了 BCL-2 家族中的促凋亡前体蛋白，如 BAD 或 BAX，使它们从胞质溶胶转移到线粒体外膜（插入到外膜中），使线粒体外膜的通透性发生改变，使原本松散结合于线粒体内膜外表面的细胞色素 *c* 从线粒体膜间隙进入胞质溶胶。在不到 5min 的时间内，细胞色素 *c* 全部从凋亡的线粒体释放到胞质溶胶，因此推测细胞色素 *c*（以及随细胞色素 *c* 一起释放到胞质溶胶的某些线粒体膜间隙的基础蛋白）是传递细胞凋亡的关键信号。细胞色素 *c* 进入胞质溶胶之后，与 Apaf-1 因子、前体 caspase-9 等装配成多蛋白的复合物，将前体 caspase-9 激活（与 caspase-8 不同的是，复合物中的前体 caspase-9 无须经过切割即可激活）。激活的前体 caspase-9 作为起始 caspase，激活下游的执行 caspase，再由执行 caspase 作用于靶蛋白引起细胞的程序性死亡。致于细胞色素 *c* 如何传递细胞凋亡信号的机制，目前尚不清楚。

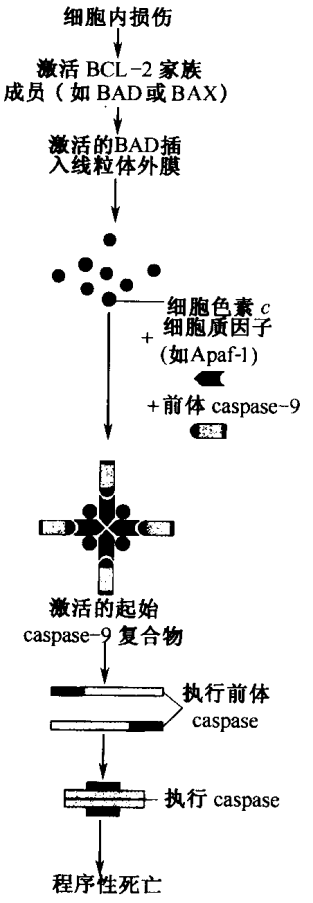


图 14-16 线粒体介导的细胞凋亡途径（引自 Karp，1999）

细胞内各种胁迫信号引起 BCL-2 家族的预凋亡胞质蛋白，如 BAD、bAX 等从胞质溶胶转位插入到线粒体外膜。这些蛋白插入到线粒体外膜之后，引起线粒体膜间隙中的细胞色素 *c* 向胞质溶胶释放，细胞色素 *c* 进入胞质溶胶后与胞质溶胶中的 Apaf-1 蛋白、前体 caspase-9 等组装成多亚基的蛋白复合物。前体 caspase-9 在 Apaf-1 的诱导下，通过构型改变被激活，然后激活执行 caspase，引起程序性细胞死亡。按照这种模型，每一个激活的前体 caspase-9 需要一分子的 Apaf-1 作为辅助因子。

14.2.4 程序性细胞死亡的生物学意义

在发育和成年组织中进入程序性死亡的细胞数量大得惊人。例如正在发育中的脊椎动物的神经组织中，大约有半数以上的神经细胞在形成后不久就要正常死亡。在健康的成年人体的骨髓和肠组织中每小时大约有 10 亿个细胞死亡。动物机体靠对细胞增殖和细胞周期的正负控制以及对程序性细胞死亡的正负控制来维持细胞总数的平衡和机体的生命活力（图 14-17）。

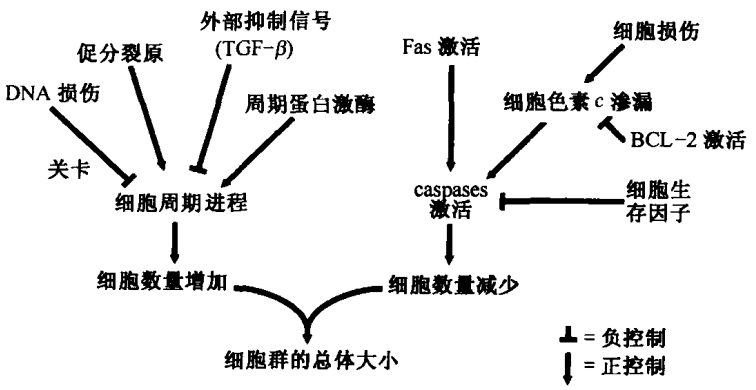


图 14-17　动物机体的细胞数量控制的途径（引自 Griffiths，1999）

程序性细胞死亡在形态建成中起重要作用。如手指和脚趾在发育的早期是连在一起的，通过程序性细胞死亡使一部分细胞进入自杀途径才将单个指加以分开（图 14-18）。

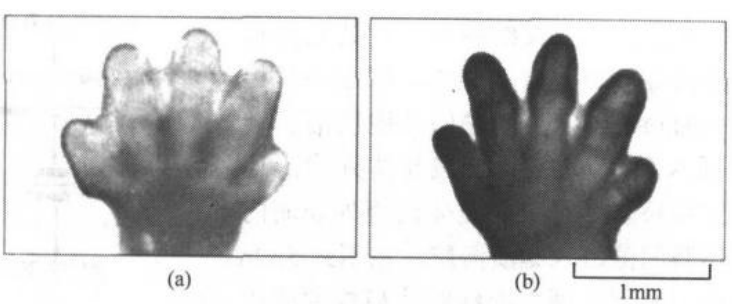


图 14-18　程序性细胞死亡在小鼠脚趾形成中的作用（引自 Alberts *et al*.，1998）
（a）开始时脚趾是相连在一起的；（b）经程序性细胞死亡使脚趾分开。

另外，对于生物发育成熟后一些不再需要的结构通过程序性细胞死亡加以消除。例如蝌蚪的尾巴就是靠程序性细胞死亡消除的（图 14-19）。

细胞的程序性死亡不仅参与形态发生，而且能够调节细胞的数量和质量。例如在神经系统的发育过程中，神经细胞必须通过“竞争上岗”获得生存的机会。在胚胎中产生的神经细胞一般是过量的，然后通过竞争数量有限的从靶细胞分泌出来的生存因子，只有那些获得足够生存因子的神经细胞才能生存下去，而其他的神经细胞将会经由程序性死亡而消失（图 14-20）。

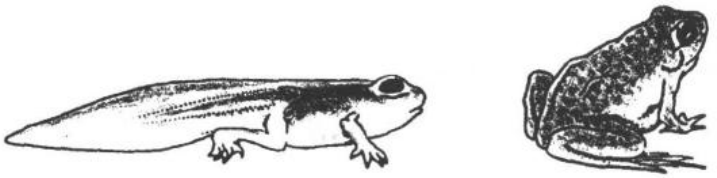


图 14-19　在蝌蚪向蛙发育的变态反应中程序性细胞死亡的作用（引自 Alberts *et al*., 1998）
当蝌蚪变成蛙时，尾巴经程序性细胞死亡而消失。主要是因血液中甲状腺激素的增加而诱导的程序性细胞死亡所致。

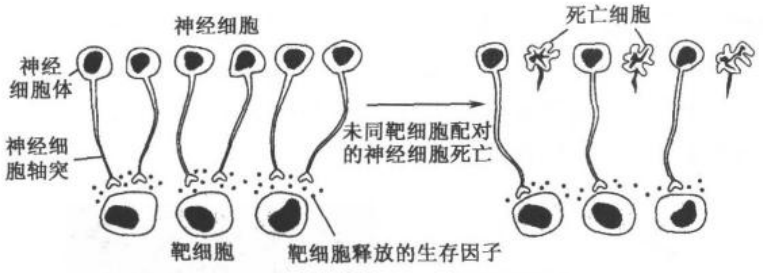


图 14-20　程序性细胞死亡对发育中神经细胞数量的调节（引自 Alberts *et al*., 1998）
生成的神经细胞多于能够支持它们生存的生存因子的数量，这些生存因子是由靶细胞释放出来的。某些得不到生存因子的神经细胞则通过程序性细胞死亡而消失。

14.3　癌细胞

所谓癌细胞实际上是一种突变的体细胞，这种突变体脱离了细胞社会关于增殖和存活的控制，因此可以无限制地增殖产生肿瘤。

14.3.1　癌生物学

“cancer”一词源于拉丁语“crab”，是用于描述一种由于体内组织的无限生长，最后夺去生命的疾病。癌细胞与正常的细胞有很大的不同，有许多特有的生物学特征。

14.3.1.1　癌的类群

体内的任何组织都有可能形成癌。根据癌变涉及的细胞类型的不同，癌分为 3 个类群：①癌（carcinoma），是最常见的一种类型，主要是从组织的外表面和内表面生长的癌，如肺癌、乳腺癌和结肠癌等；②瘤（sarcoma），主要是源于中胚层形成的支持组织（骨、软骨、脂肪、结缔组织和肌组织等）中形成的癌；③淋巴瘤（lymphoma）和白血病（leukemia），是由淋巴和血液产生的癌，白血病主要是指癌细胞已经大量进入血液中。

14.3.1.2 癌细胞的基本特性

癌细胞与正常细胞在结构上和化学性质上都有很大的不同，就是不同类群癌细胞之间也有很大差异，所以难以描述癌细胞的典型特征。通过体外培养了解一些关于癌细胞的行为和特性。

(1) *失去生长的接触抑制*　正常细胞在体外培养时，细胞通过分裂增殖并铺满培养器皿的表面形成单层（monolayer）后即停止分裂（图 4-21a，b），曾将细胞达到相互接触时停止分裂的现象称作接触抑制（contact inhibition）。由于培养基中的生长因子耗尽时也会产生生长抑制，所以将正常细胞因相互接触而抑制分裂的现象改称为密度依赖性生长抑制（density-dependent inhibition of growth）。在相同条件下培养的恶性细胞（malignant cell）对密度依赖性生长抑制失去敏感性，因而不会在形成单层时停止生长，而是相互堆积形成多层生长的聚集体（图 14-21c，d），这种现象也说明恶性细胞的生长和分裂已经失去了控制，调节细胞正常生长和分裂的信号对于恶性细胞已不再起作用。

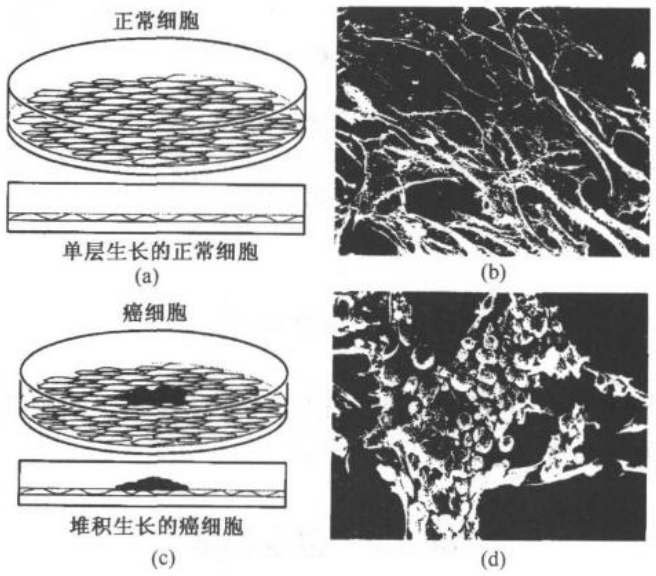


图 14-21　正常细胞与癌细胞生长特性比较（引自 Karp，1999）

正常细胞体外培养时，在培养器皿表面形成单层即停止生长（a，b）；而由病毒转化的或由致癌化学物质诱导的恶性细胞会成堆生长（c，d）。

(2) *自分泌激活*　在正常情况下，生长因子是控制细胞周期的信号分子，调节细胞分裂的速率。但是，某些癌细胞能够分泌刺激自身增殖的生长因子促进自身分裂（图 14-22）。

体外培养的正常细胞通常对血清有依赖性，即在培养基中需补充一定浓度的血清才能正常生长。血清的作用是提供生长因子，如表皮生长因子、胰岛素等。由于癌细胞能够不正常合成生长因子刺激自身的分裂，破坏了生长因子对细胞周期的控制作用，使癌细胞失去了对正常生理条件下生长因子的依赖性，所以在体外培养时也就失去对血清的依赖性（图 14-23）。

(3) *细胞死亡特性改变*　当正常细胞在生长因子不足、受到毒性物质伤害、受到 X 射线照射、DNA 损伤等不良因素情况时，就会启动程序性细胞死亡，让这些细胞进入死亡途

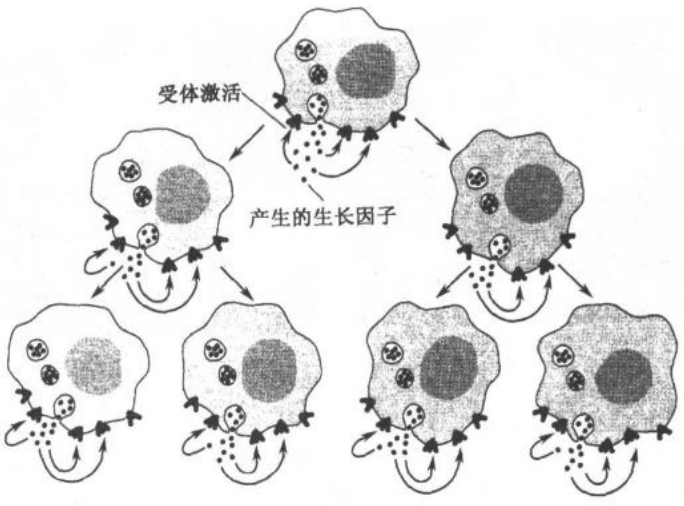


图 14-22　自分泌生长刺激（引自 Cooper，2000）

径，避免分裂产生缺陷细胞。但是，癌细胞丧失了程序化死亡机制，这也是导致癌细胞过渡增殖的主要原因之一。

（4）失去了间隙连接　正常细胞通过间隙连接与其周围细胞保持代谢偶联和电偶联，这对于细胞和组织的生长控制具有重要作用。研究发现，癌细胞的间隙连接减少，如将荧光染料注入正常的细胞后，染料很快向周围细胞扩散，但是将荧光染料注入癌细胞，则只停留在被注射的细胞内，这一实验说明癌细胞之间的通讯连接有了缺陷。这样，同一组织内的细胞间就失去了通讯联系，只好“各敲各的锣，各吹各的号”，整个组织就失去了协调性。

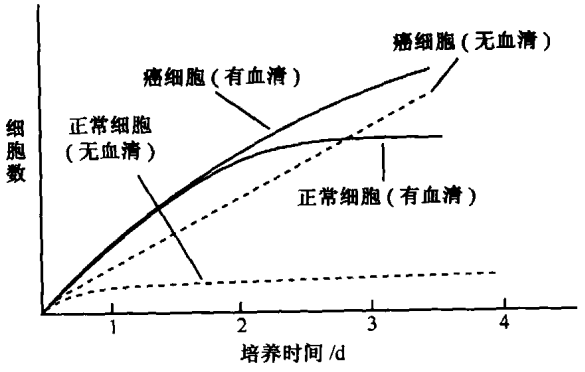


图 14-23　血清对正常细胞和癌细胞生长的影响
（引自 Karp，1999）
培养基中有没有血清，对癌细胞的生长影响不大，但没有血清时，正常细胞基本停止生长。

（5）染色体异常　癌细胞细胞核的显著变化就是染色体的变化。正常细胞在生长和分裂时能够维持二倍体的完整性，而癌细胞常常出现非整倍性（aneuploidy），有染色体的缺失或增加。一般而言，正常细胞中染色体整倍性的破坏，会激活导致细胞程序性死亡的信号，引起细胞的程序性死亡。但是癌细胞染色体整倍性的破坏，不会进入程序性死亡，因这种细胞对程序性死亡的信号已不再敏感了。这也是癌细胞区别于正常细胞的一个重要指标。

（6）细胞骨架的变化　由于癌细胞的细胞骨架变化较大，导致形态发生很大变化。正常细胞的细胞质中有高度组织化的细胞骨架网络结构，而癌细胞中的细胞骨架不仅少而且杂乱无章（图 14-24）。

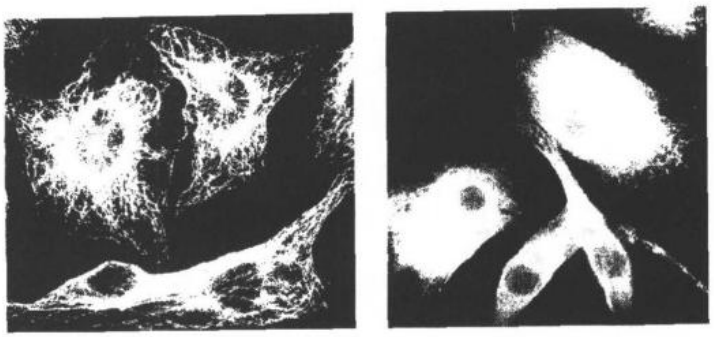


图 14-24　正常细胞和癌细胞微管骨架的比较（引自 Karp, 1999）

用微管蛋白抗体制备的细胞微管骨架的免疫荧光照片。(a) 用温度敏感的肿瘤病毒感染并在高温下培养的成纤维细胞，由于在高温下温度敏感病毒在转化细胞中不起作用，所以细胞骨架是正常的。(b) 同样转化的细胞在低温下培养，表现出转化的表型，细胞骨架的组织遭到破坏。

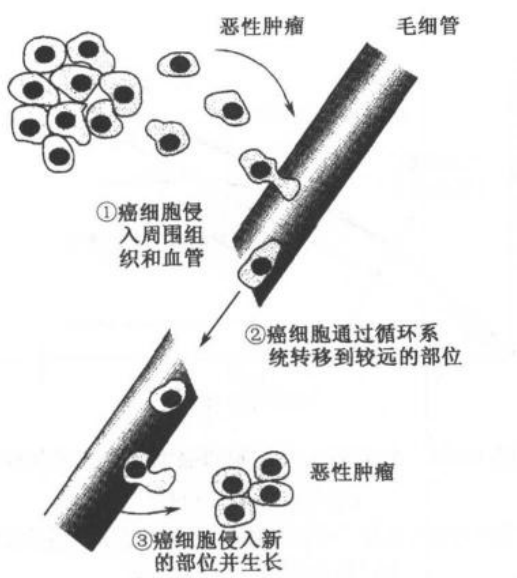


图 14-25　肿瘤转移的过程(引自 Kleinsmith *et al*., 1995)

在肿瘤组织中只有极少数的肿瘤细胞能够进行转移：①肿瘤细胞侵袭周围的组织和血管，②肿瘤细胞经由循环系统进行转移；③在新的部位生长形成肿瘤。

(7) 细胞表面蛋白减少，细胞黏着降低　一些恶性肿瘤常常会合成和分泌一些蛋白酶，降解细胞的某些表面结构，降低了细胞黏着。正因为癌细胞失去了黏着特性，使得癌细胞具有在体内转移的能力。

14.3.1.3　癌细胞转移

肿瘤是一种基因性疾病，因为所有的肿瘤都与基因的改变有关；但肿瘤与先天性遗传疾病不同，后者系缺陷基因通过性细胞传递到子代而发病，而肿瘤主要是体细胞后天获得性 DNA 的改变导致细胞无节制地增殖，这种增殖不断侵袭周围正常组织，导致疾病。只要生长的肿瘤保持局部性，就可通过外科手术将肿瘤切除进行治疗。恶性肿瘤细胞能够突破其所在环境的束缚，进入淋巴管或血管在体内转移(metastasis)，在新的部位产生致死性的二级肿瘤（图 14-25），那时就难以治疗。

14.3.2　癌的起因：物理和化学致癌物

引起癌细胞发生的原因很多，大致分为 4 种类型：化学因素、辐射、病毒和遗传。化学因素主要是各种化学致癌物；物理因素主要是紫外光等的辐射作用。病毒和遗传则是指病毒

癌基因和细胞癌基因。

14.3.2.1 化学致癌物

英国伦敦医生 Hill 在 1761 年首次提出化学致癌观点。1775 年，另一位英国外科医生 Pott 获得环境因子与癌发生的相关证据。他发现一些男性烟囱清洁工人的鼻腔和阴囊皮肤等是癌的高发部位，原因是过度与煤烟接触有关。在过去几十年内，经动物实验，已经从煤烟中分离出几百种致癌化学物质。后来发现煤炭工业、印染工业中的某些化学物质也具有致癌性。表 14-4 列出了一些常见的化学致癌物质。

表 14-4 空气、食品、水、车间等环境中存在的某些化学致癌物

化学致癌物	诱发癌的部位
丙烯腈（acrylonitrile）	结肠、肺
4-氨基二苯（4 - aminodiphenyl）	膀胱
苯胺衍生物（aniline derivative）	膀胱
砷化合物（arsenic compond）	肺、皮肤
石棉（asbestos）	肺、间皮
苯（benzene）	白血病
镉盐（cadmium salt）	前列腺、肺
四氯化碳（carbon tetrachloride）	肝
铬与铬酸盐（chromium and chromate）	肺、鼻窦
二乙基乙烯雌酚（diethylstilbestrol）	子宫、阴道
铅（lead）	肾
芥子气（mustard gas）	肺、喉
α-萘胺（α-naphthylamine）	膀胱
镍（nickel）	肺、鼻
有机氯杀虫剂（organochloride pesticide）	肝
聚氯联苯（polychlorinated biphenyl）	肝
氡（radon）	肺
煤烟和焦油（soot and tar）	皮肤、肺和膀胱
乙烯氯（vinylchloride）	肝、肺和脑
吸烟	肺、口腔、胃、喉、食管、胰

由于人类生活在一个十分复杂的环境中，而且所接触到的各种致癌物随着工业的发展而发生不断的变化，所以很难确切地得出癌与致癌物的关系。由于各人的生理和心理素质不同、生活习性的不同，对癌的易感性也是不同的。人饮食中的某些成分，如动物脂肪、乙醇等可提高癌的发病率；而水果和蔬菜中的某些成分则有利于降低癌的易感性。

14.3.2.2 辐射对癌的诱发

人类在自然环境中受到的辐射主要来自太阳的紫外线、外层空间的宇宙射线（cosmic ray）以及自然发生的放射性元素的放射性（emission）。另外，还受到来自医疗、工业和军事活动中人为产生的高能辐射，这些辐射主要是 X 射线和放射活性。阳光致癌作用主要通过对热带地区长时间在太阳下工作的人们的观察推测的，因为他们皮肤癌的发病率相当高，并且只有那些暴露于阳光的部位易感皮肤癌；被遮盖的部位或用可吸收紫外辐射防护剂进行保护都会降低皮肤癌的诱发。

由于 X 射线具有较强的穿透力，可以穿透皮肤到达内部器官，所以致癌能力远较紫外线强。1895 年，Roentgen 发现受这种辐射的人，其癌的易感性大大增加，后来通过动物实验证实了 X 射线对癌的诱发。但是在临床上，X 射线对某些疾病的治疗效果远大于对癌的诱发。不过 X 射线治疗带来的副作用是肯定的，如某些国家，在临床上采用 X 射线处理头和颈部浅表皮肤癣、粉刺，其甲状腺癌的发病率比其他国家高。因此在利用 X 射线作为治疗手段时一定要权衡利弊。

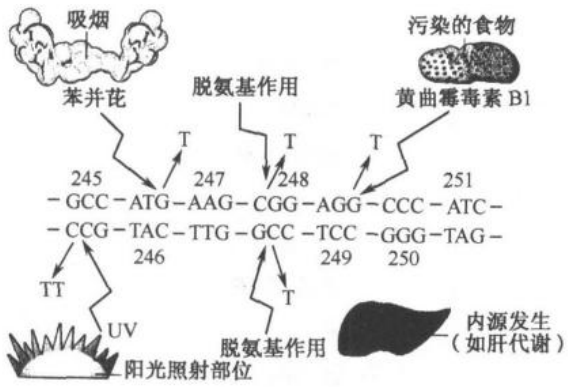


图 14-26 某些化学致癌物的作用机制（引自 Karp, 1999）图中随机挑选了 *P53* 基因中 7 个密码子，这些密码在人的癌症病人中有 50% 会发生缺失或突变。图中显示了几种不同致癌物，包括苯并芘［benzo（a）pyrene］（它是在香烟的烟雾中发现的）、黄曲霉毒素 B1、阳光中的紫外光等作用于该序列引起突变的机制。每一种致癌物都引起一种不同的碱基置换。图中也显示了由于内源代谢引起的脱氨作用，也会导致 C→T 突变。

一些放射性元素的辐射对癌的诱发效应同 X 射线相类似。第一位从事放射性研究的科学家居里夫人发现了放射性元素镭，她后来死于白血病，这显然与她过度与放射性接触相关。

关于化学致癌物和辐射等因素对癌的诱发机理目前很不清楚，通过对一些特别致癌物的分析，发现与 DNA 突变有关。图 14-26 是几种致癌物对 DNA 的诱变作用。在亚洲，一些储藏在潮湿条件下的坚果、谷类容易长黄曲霉，这些真菌产生的黄曲霉毒素 B（aflatoxin B）是肝癌的主要诱发者。其机制是黄曲霉毒 B 能够引起肿瘤抑制基因 *P53* 的第 249 位密码中的碱基置换，即 G→T，因此在普查中可作为肝癌检测的一种指标。虽然毋庸置疑食物和环境中的诱变剂是致癌的因素，但大多数致癌的突变主要来自正常代谢过程中的 DNA 损伤。

14.3.3 肿瘤发生遗传学

在西方国家，癌是引起死亡的主要疾病，大约每 3 个人中就有一个患有癌症，可见癌是一种非常之常见的疾病。但从细胞水平上看，癌的发育又是极偶然的事件。从遗传上看，癌都是由一个细胞发展而来，由一个失去了增殖控制的细胞发展而来，因此可以说癌是单克隆

的。人体有百万兆的细胞，每天都有几十亿个细胞进行分裂，理论上，几乎任何一个细胞都有可能由遗传成分的改变而癌变，但实际上并非如此。

14.3.3.1 癌发生的进程

细胞的恶性转化需要发生多个遗传改变，即一个细胞发生多次遗传突变；因此癌的发生是一个渐进式的过程，涉及多级反应和突变的积累。在此过程中，癌变的细胞系越来越不受体内调节机制的控制，并逐渐向正常组织侵染。在细胞发生恶性转变之后，癌细胞继续积累突变，赋予突变细胞新的特性，使癌细胞更具危险性。癌细胞遗传上的不稳定性，使得医务人员难以用通常的化学治疗手段对肿瘤进行治疗。关于癌发生的渐进性，有两个研究得较深入的例子，即结肠癌（colon cancer）和一种脑瘤——星形细胞瘤（astrocytoma），它们的癌变过程是先后发生几种突变并积累的过程（图 14-27）。

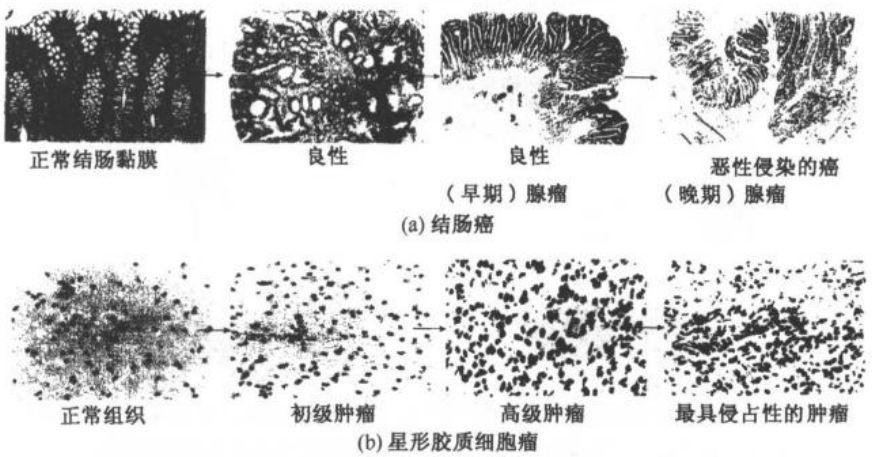


图 14-27 结肠癌和脑瘤恶性转变的多步发展过程（引自 Griffiths，1999）

图中的组织学照片揭示结肠癌和脑瘤由正常细胞→转变成良性肿瘤→转变成恶性肿瘤的发展过程中几个明显可分的阶段。(a) 结肠癌在癌变程中顺序突变事件，注意结肠癌在癌变过程中组织结构由有序向无序的变化。(b) 星形细胞瘤癌变过程中顺序突变及形态变化，具有与结肠癌发生过程不同的特征。

某些恶性肿瘤发生的第一步是形成良性肿瘤（begign tumor），良性肿瘤的增殖也不受正常调控作用的影响，但是不会侵染其他组织，不能进行远距离转移。不过有些良性肿瘤很快转变成恶性肿瘤，有些则相当慢。

根据对结肠癌发生过程的形态变化及突变分析，提出了关于结肠癌发生的遗传渐进模型（图 14-28）。在癌发展过程的不同阶段发生不同的基因突变，如多发性结肠癌基因（adenomatous polyposis colon gene，APC gene）基因是结肠癌发生过程中第一个发生突变的基因。而 *P53* 基因则是结肠癌发展过程的后期发生突变的基因。

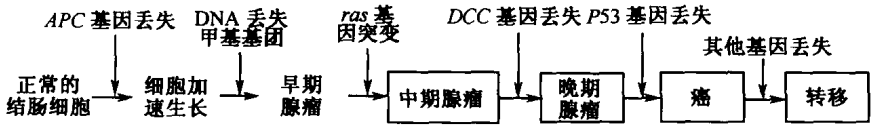


图 14-28 结肠癌发生过程中可能涉及的基因突变及顺序（引自 Lodish *et al.*，1999）

14.3.3.2 肿瘤抑制基因、癌基因与原癌基因

癌的发生涉及两类基因：肿瘤抑制基因（tumor suppressor gene）与癌基因（oncogene）。肿瘤抑制基因是细胞的制动器（brake），它们编码的蛋白质抑制细胞生长，并阻止细胞癌变。在正常的二倍体细胞中，每一种肿瘤抑制基因都有两个拷贝，只有当两个拷贝都丢失了或两个拷贝都失活了才会使细胞失去增殖的控制，只要有一个拷贝是正常的，就能够正常调节细胞的周期（图 14-29a），从此意义上说，肿瘤抑制基因的突变是功能丧失性突变。相反，癌基因则是细胞加速器，它们编码的蛋白质使细胞生长不受控制，并促进细胞癌变(图 14-29b)。大多数癌基因都是由与细胞生长和分裂有关的正常基因（原癌基因）突变而来。

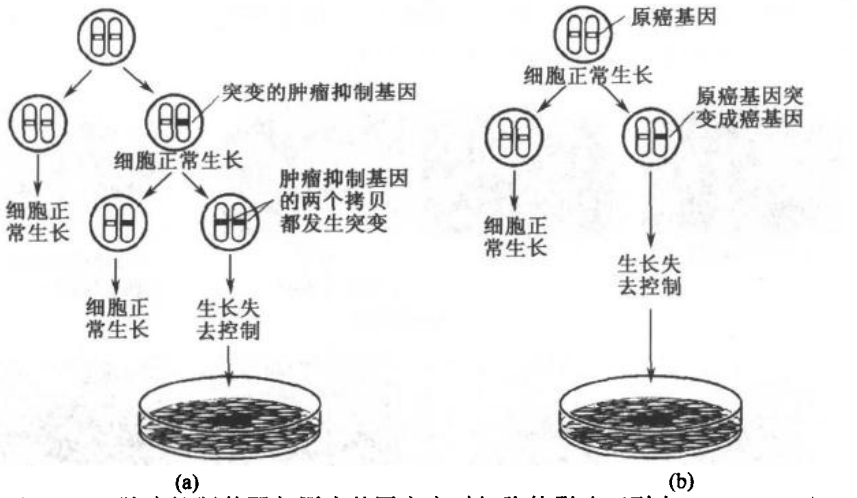


图 14-29 肿瘤抑制基因与原癌基因突变对细胞的影响（引自 Karp, 1999）

(a) 肿瘤抑制基因突变对细胞的影响；(b) 原癌基因突变对细胞的影响。

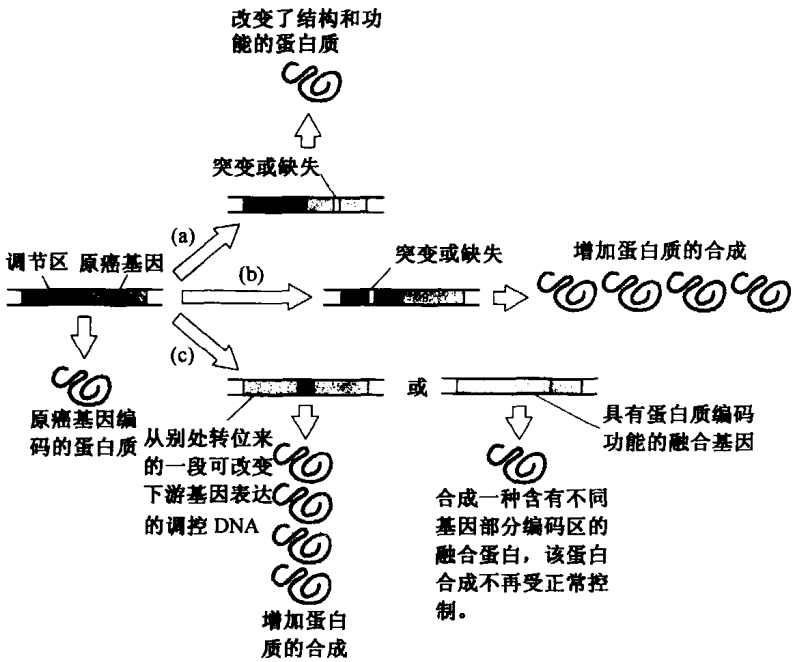


图 14-30 原癌基因激活成癌基因（引自 Lodish *et al.*, 1999）

(a) 原癌基因编码区突变；(b) 调节区突变；(c) DNA 发生重排。

所谓原癌基因（proto-oncogene），即是细胞的正常基因，它们编码的蛋白质在正常细胞中通常参与细胞的生长与增殖的调节。但突变后成为促癌癌基因（cancer-promoting oncogene），或改变了编码蛋白的结构或改变了蛋白质的表达方式导致细胞癌变。

原癌基因突变成癌基因，称为原癌基因的激活。有几种可能的机制使原癌基因激活（图 14-30）。①原癌基因的编码区发生突变，改变了原有的基因结构，致使编码产物的性质发生变化，使其不再具有正常的活性；②原癌基因的调节区发生突变从而改变了结构基因表达方式，有可能大大增加表达量；③通过染色体重排，使不在一起的基因序列同原癌基因排列在一起，可能会合成新的蛋白质或融合蛋白，改变了原有基因的自然活性。

上述的任何一种突变，都有可能使细胞失去正常的分裂控制，从而向恶性方向转变。

14.3.3.3 病毒癌基因与癌的诱发

就癌基因的来源分为两类，一类是细胞癌基因（cellular oncogene，c-onc），由细胞原癌基因突变而来；另一类是病毒癌基因（viral oncogene，v-onc）。大约已经鉴定了 100 多种不同的癌基因，它们中的大多数属于 RNA 肿瘤病毒基因组中的基因。

劳氏肉瘤病毒（Rous sarcoma virus，RSV）是一种 RNA 病毒，可使鸡产生肉瘤。第一个病毒癌基因就是在 RSV 中发现并鉴定的，即 *src* 基因。20 世纪 70 年代，Vogt 分离到一种 Rous 病毒的突变体，该突变病毒能够感染细胞并进行复制，但是不能致癌。由于该突变体只是丧失了将正常细胞转化为癌细胞的能力，因此推测突变的基因是诱导癌变的基因。后来的分析鉴定发现，该突变体只是缺失了一个基因。由于该基因的缺失，不能诱导肉瘤的形成，故将此基因命名为 *src* 基因，是一种病毒癌基因。近几年的研究表明，许多致癌病毒中的癌基因不仅与致癌密切相关，而且与正常细胞中的某些 DNA 序列同源，从而推测病毒癌基因起源于细胞的原癌基因。首先是古代的反转录 RNA 病毒感染宿主细胞后将病毒 RNA 反转录成双链的 DNA，然后在宿主染色体的原癌基因旁整合。在病毒成熟前，病毒 DNA 要转录成 RNA，但将原癌基因也一起转录下来；后经过突变，使原癌基因突变成癌基因，成为病毒 RNA 的一部分被包装进入病毒的蛋白质外壳内（图 14-31）。

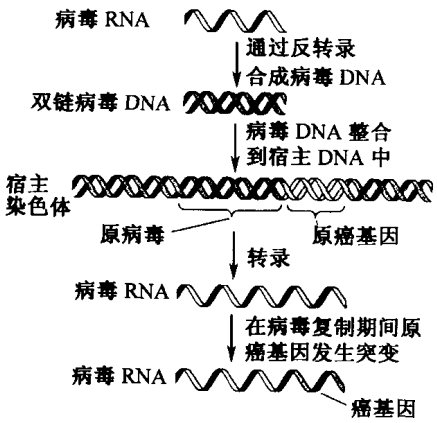


图 14-31 RNA 肿瘤病毒癌基因起源的假说模型（引自 Kleinsmith *et al.*，1995）

除了 RNA 病毒引起细胞癌变外，有些 DNA 病毒也能引起细胞癌变。表 14-5 列出了部分与肿瘤有关的 DNA 病毒和 RNA 病毒。

由于肿瘤病毒的感染会诱发被感染生物的细胞癌变，从癌细胞中分离的 DNA 是否也具有诱发细胞癌变的能力？在 20 世纪 80 年代早期，Weinberg 和 Cooper 通过基因转移实验证明非病毒的癌基因也能诱发细胞癌变（图 14-32）。

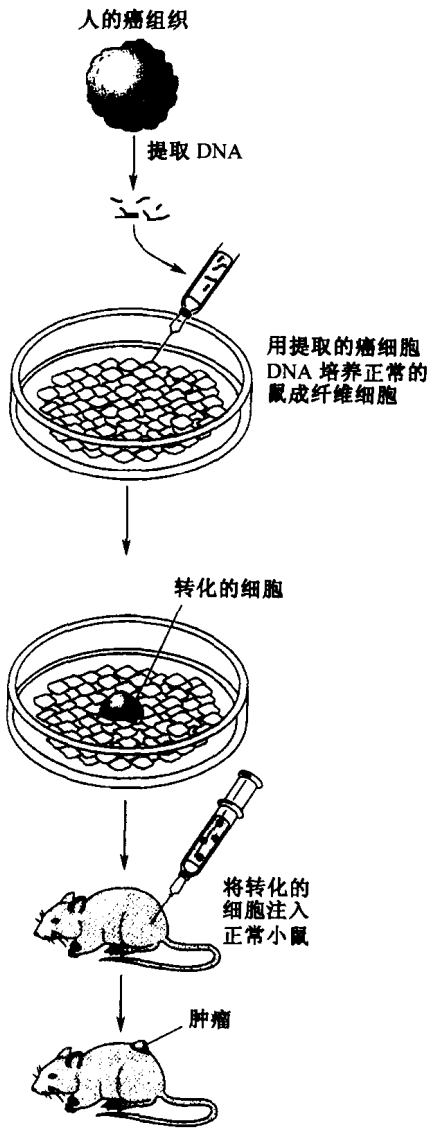


图 14-32　DNA 转移对癌的诱导
（引自 Kleinsmith *et al.*, 1995）
从人的癌细胞中分离 DNA，然后将分离的癌细胞 DNA 导入培养的正常鼠的成纤维细胞，某些鼠的成纤维细胞进行了恶性转化。将转化的癌细胞注入正常小鼠体内，正常小鼠长出了瘤。

表 14-5　部分 DNA 和 RNA 肿瘤病毒

病毒	诱导的肿瘤	生物
DNA 病毒		
吕克氏病毒	肾腺癌	蛙
非洲淋巴瘤病毒	非洲淋巴瘤、鼻咽癌	人
禽麻痹病病毒	淋巴瘤	鸡
兔乳头瘤病毒	乳头瘤	兔
SV-40	皮下、肾和肺肉瘤	人
多瘤病毒	肝、肾、肺、骨、血管、神经组织、结缔组织多形瘤	鼠
人乳头瘤病毒	宫颈癌	人
人的腺病毒	皮下、腹膜内、颅内腺瘤	仓鼠
RNA 病毒		
劳氏肉瘤病毒	肉瘤	鸟、哺乳动物
鼠白血病病毒	白血病	鼠
人 T 细胞白血病病毒	白血病/淋巴瘤	人
禽类白血病病毒	白血病	鸡
猫肉瘤病毒	肉瘤	猫

14.3.3.4　原癌基因与癌发生

细胞增殖受一系列基因表达产物——蛋白质的控制，将参与细胞增殖控制的蛋白质分为 7 种类型（图 14-33）：①生长因子（growth factor）；②生长因子受体（growth-factor receptor）；③信号转导蛋白（signal transduction protein）；④转录因子（transcription factor）；⑤抗凋亡蛋白（anti-apoptotic protein）；⑥细胞周期控制蛋白（cell-cycle control protein）；⑦DNA 修复蛋白（DNA-repair protein）。这 7 种类型的蛋白质中，有些是原癌基因的编码产物，它们突变后会导致细胞癌变。其中编码①～④类蛋白的原癌基因突变是显性突变，因为两个拷贝中只要有一个拷贝突变就会激活癌基因，导致细胞癌变；编码⑥类蛋白的是肿瘤抑制基因，它们的突变是隐性突变，只有当两个拷贝都发生突变时，细胞才会癌变。编码⑦类蛋白的基因发生突变，导致在代谢过程中造成的 DNA 损伤不能修复，会极大地提高其他类型突变的概率。表 14-6 列出了部分人的原癌基因和它们突变后引起的癌症。

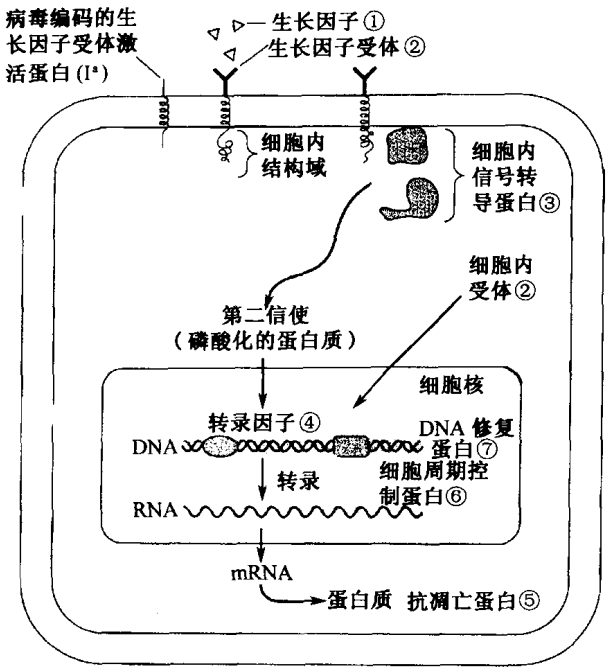


图 14-33　参与细胞生长控制的 7 种类型的蛋白质（引自 Lodish *et al*., 1999）

表 14-6　原癌基因与人类肿瘤

原癌基因	突　变	肿　瘤
abl	易位	慢性髓细胞性白细胞
bcl-2	易位	B 细胞淋巴瘤
CYCD1	易位	乳腺癌
Cdk-4	扩增	肉瘤
erbB	扩增	鳞状细胞癌、星形细胞瘤
neu/HER2	扩增	乳腺腺癌、卵巢腺癌、胃腺癌
gip	点突变	卵巢癌、肾上腺癌
gsp	点突变	垂体腺瘤、甲状腺瘤
myc	易位	非洲淋巴瘤
	扩增	肺癌、乳腺癌、子宫茎癌
L-*myc*	扩增	肺癌
N-*myc*	扩增	成神经细胞瘤、肺小细胞癌
H-*ras*	点突变	结肠癌、肺癌、腺癌、黑素瘤
K-*ras*	点突变	极性髓样和成淋巴细胞白血病、甲状腺、黑素瘤
N-*ras*	点突变	生殖泌尿、甲状腺癌和黑素瘤
ret	DNA 重排	甲状腺癌
trk	DNA 重排	甲状腺癌

癌基因是由原癌基因突变而来，而原癌基因的产物在正常细胞中是有功能的。大多数已知的原癌基因在细胞生长的控制中起重要作用，属于正控制；有些原癌基因的产物参与程序性细胞死亡的控制，属负控制。

原癌基因突变成癌基因后，其编码产物的作用是促进细胞生长不受控制，并使细胞向恶性方向转变。例如编码血小板衍生长因子（PDGF）的原癌基因的调控区发生突变后，导致PDGF的大量合成，过量的血小板衍生长因子使细胞增殖失去控制，从而转变成癌细胞。有些癌基因编码活性过度的受体或活性过强的细胞内信号转导蛋白，它们可在没有外源信号的情况下促使细胞过度增殖从而癌变（图 14-34）。

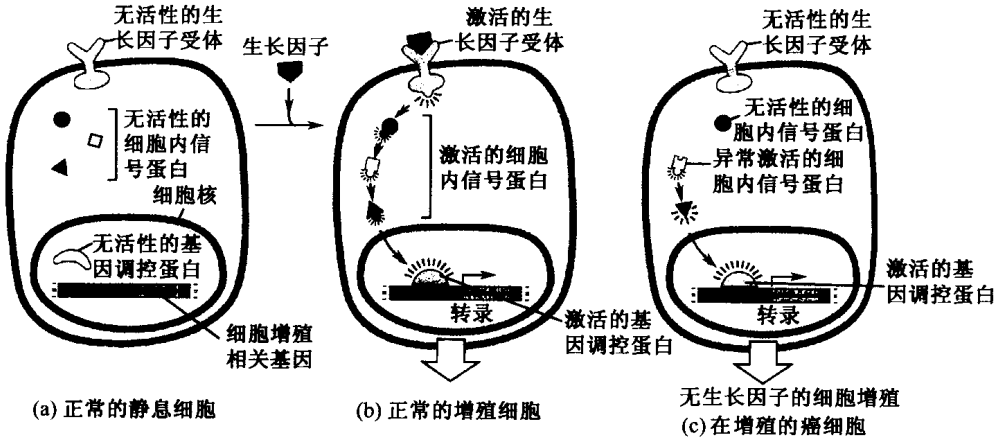


图 14-34　正常的细胞增殖与由癌基因引起的细胞异常增殖的比较（引自 Alberts *et al*., 1998）
（a）在正常的静息细胞中，细胞内能被细胞外信号激活的蛋白质和基因都是无活性的；（b）当正常的细胞受到细胞外生长因子刺激时，这些信号蛋白和基因被激活，从而使细胞进行增殖；（c）在癌细胞中，编码信号蛋白的原癌基因突变成为癌基因，它的产物不再需要细胞生长因子的作用就具有活性。

14.3.3.5　肿瘤抑制基因与癌变

正常细胞转变成癌细胞，是由于一个或多个肿瘤抑制基因丢失的结果。目前推测人的基因组织中大约有 20 多种肿瘤抑制基因。表 14-7 列出了部分肿瘤抑制基因及它们的作用，其中包括编码转录因子的基因（*P53* 和 *WT1*）、编码细胞周期调节子基因（*RB* 和 *P16*）、编码参与信号转导途径调控蛋白的基因（*NF1* 基因）等。在正常细胞中，肿瘤抑制基因的产物作为细胞增殖的负调控器，因此，它们的突变将会使细胞的增殖失去控制。

RB 基因是世界上第一个被克隆和完成全序列测定的肿瘤抑制基因，为成视网膜细胞瘤易感基因，*RB* 基因转录产物约 4.7kb，表达产物为 928 个氨基酸组成的蛋白质，分子质量约 105kDa，称为 P105-RB。RB 蛋白分布于核内，是一类 DNA 结合蛋白。RB 蛋白的磷酸化/去磷酸化是其调节细胞生长分化的主要形式，在细胞周期的 G_0、G_1 期，它表现为去磷酸化，在 G_0、S、M 期则处于磷酸化状态。RB 蛋白磷酸化的改变受一种广泛存在于真核细胞的胞周期调节物 Cdc2/Cdc28 调节。一般认为 RB 蛋白在控制细胞周期的信息系统中起关键作用，脱磷酸化的 RB 具有抑制细胞增殖的活性，是 RB 的活性形式（图 14-6）。

表 14-7　肿瘤抑制基因的功能及突变后引起的肿瘤

基　因	原发肿瘤	功　能	遗传综合征
APC	结肠	与转录因子 β-连环蛋白结合	家族性多发性腺瘤
BRCA1	乳腺	转录因子；DNA 修复	家族性乳腺癌
MSH2，*MLH1*	结肠	错配修复	HNPCC
E-Cadberin	乳腺，结肠等	细胞黏着分子	家族性胃癌
INK4α	黑素瘤，胰	p16：CDK 抑制蛋白	家族性黑素瘤
		$p19^{ARF}$：稳定 p53	
NF1	神经纤维瘤	激活 Ras 的 GTPase	I 型神经纤维瘤
NF2	脑膜瘤	连接膜与细胞骨架	II 型神经纤维瘤
P16（*MTS1*）	黑素瘤	Cdk 抑制剂	家族性黑素瘤
P53	肉瘤，淋巴瘤等	转录因子（细胞周期与凋亡）	Li-Fraumeni 综合征
PTEN	乳腺，甲状腺	磷酸酶	Cowden 综合征
RB	视网膜	与 E2F 结合（细胞周期调控）	成视网膜细胞瘤
VHL	肾	调节 RNA 聚合酶 II 的延伸作用	Von-Hippel-Landau 综合征
WT1	肾维耳姆斯氏瘤	转录因子	Wilms 瘤

RB 基因与癌的关系有两种情况：一种是某些家族的青年人中高频率发生成视网膜细胞瘤；另一种是在无家族关系人群的较年长者中散布发生。成视网膜细胞瘤发生的家族性表明该病是可遗传的。从成视网膜细胞瘤儿童的细胞中进行的遗传分析，发现患者 13 号染色体有一小段缺失，并且这种缺失不仅是肿瘤细胞，而且在身体其他所有组织中都缺失的，这表明该缺失是遗传下来的。

从遗传表型看，成视网膜细胞瘤是显性遗传的，因为成视网膜细胞瘤高发家族成员的两个 *RB* 等位基因中一个拷贝是正常，另一个是异常的。但是这种显性遗传又与别的遗传病不同，*RB* 基因不是百分之百显性，在携带有 *RB* 基因缺陷的儿童中大约有 10% 不会患成视网膜细胞瘤。

关于成视网膜细胞瘤的遗传基础，1971 年得到了解释：只有在 *RB* 基因的两个拷贝都突变后才会发展成为成视网膜细胞瘤。也就是说，原癌基因的两个拷贝都发生突变后才失去肿瘤形成的抑制作用。根据这种解释，成年人中散布发生的成视网膜细胞瘤是 *RB* 基因经过了连续两次的自发突变的结果（图 14-35b），而家族性成视网膜细胞瘤儿童患者从亲代获得一个有缺陷的 *RB* 基因，只有等正常的 *RB* 基因拷贝通过自发突变才会形成成视网膜细胞瘤（图 14-35a）。虽然这种突变的频率很高，但不会 100%，这就是为什么在携带有 *RB* 基因缺陷的儿童中大约有 10% 不会患成视网膜细胞瘤的原因。

P53 基因是迄今发现与人类肿瘤相关性最高的基因。该基因编码一种分子质量为 53kDa 的磷酸化蛋白质，命名为 P53。野生型 *P53* 基因是一种肿瘤抑制基因，它的失活对肿瘤形成起重要作用。

P53 主要集中于核仁区，能与 DNA 特异结合，其活性亦受磷酸化调控。P53 在 S 期磷酸化，其抑制细胞分裂的活性消失。正常 P53 的生物功能好似“基因组卫士（guardian of the

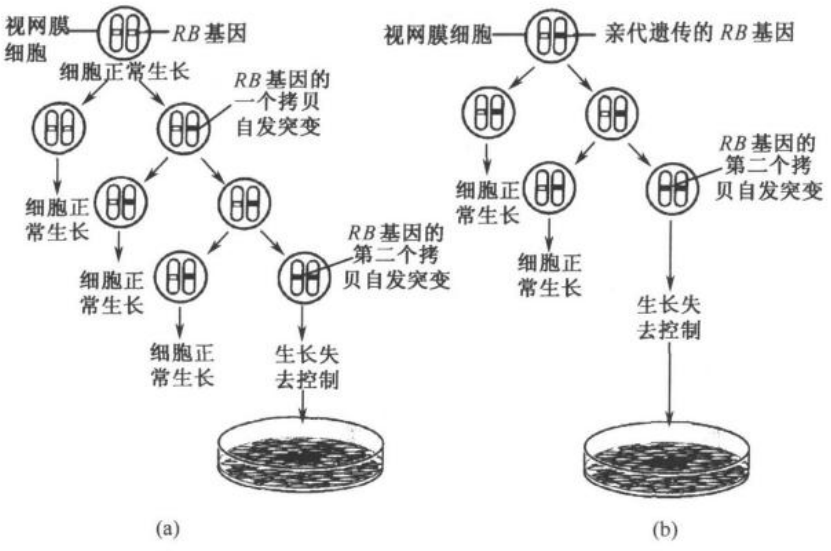


图 14-35　*RB* 基因突变与成视网膜细胞瘤（引自 Karp，1999）

（a）散布发生成视网膜细胞瘤的病人在出生时，*RB* 基因的两个拷贝都是正常的，只是在后来连续自发发生了 *RB* 基因的突变导致成视网膜细胞瘤，由于这种情况很少，并需要较长时间，所以是散布发生并在成年之后。（b）在家族性成视网膜细胞瘤病人中，他们出生时就携带了一个突变的*RB*基因拷贝，后经自发突变，使两个*RB*基因都成为突变的形式，这样很快发展为成视网膜细胞瘤。

genome)”，在 G_1 期检查 DNA 损伤点，监视细胞基因组的完整性。如有损伤，P53 蛋白阻止 DNA 复制，以提供足够的时间使损伤 DNA 修复（图 14-7）；如果修复失败，P53 蛋白则引发细胞程序性死亡阻止具有基因损伤、可能诱发癌变的细胞产生（图 14-36a）；如果 *P53* 基因的两个拷贝都发生了突变，对细胞的增殖失去控制，导致细胞癌变（图 14-36b）。

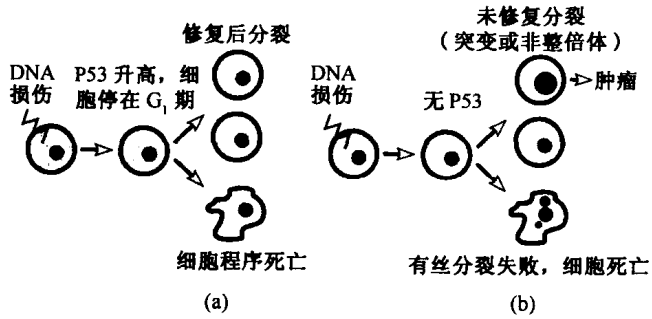


图 14-36　P53 的抑癌作用（引自 Karp，1999）

（a）*P53* 基因正常，DNA 损伤信号使 P53 蛋白稳定而升高，促使 DNA 修复，如不能修复，细胞则进入程序性细胞死亡。（b）*P53* 基因突变，DNA 损伤不能修复，导致肿瘤发生或细胞死亡。

在健康的 G_1 细胞中，P53 蛋白的浓度很低，如果 G_1 细胞受到遗传损伤（如受到紫外光照射或化学致癌物的作用），P53 蛋白的浓度会快速上升。将含有断裂链的 DNA 注入细胞，可检测到 P53 蛋白浓度的这种变化。研究表明，P53 蛋白的浓度变化不是由于 *P53* 基因表达的提高，而是由于 P53 蛋白降解的速度的下降。P53 蛋白的降解受 MDM2 蛋白的控制，该蛋

白与P53蛋白结合，并将P53蛋白由细胞核输出到细胞质，并经遍在蛋白化途径被降解。DNA损伤如何导致P53蛋白的稳定？这与*ATM*基因有关。该基因编码一种蛋白激酶，该激酶是识别DNA损伤的多亚基复合物的组成部分，这种复合物一旦与受损伤的DNA结合，ATM激酶通过使一些靶蛋白磷酸化传递细胞周期停止的信号，而P53则是被ATM激酶磷酸化的靶蛋白之一。P53蛋白磷酸化之后不再与MDM2蛋白结合从而不再被输送到细胞质中被降解，因此DNA损伤后细胞核中P53的浓度升高，从而激活*P21*基因和*BAX*基因的表达，使细胞停止分裂或使细胞进入程序性死亡。如果*P53*基因突变，等于失去了分子警察，DNA损伤引起的突变会导致细胞癌变，也就肆无忌惮了。

提　要

衰老是机体在退化时期生理功能下降和紊乱的综合表现，是不可逆的生命过程。细胞衰老是客观存在的，同新陈代谢一样，细胞衰老是细胞生命活动的客观规律。

体外培养的细胞具有一定的寿限，可分为3类：① 接近于动物的整体寿命；②缓慢更新的细胞，其寿命比机体的寿命短；③ 快速更新的细胞。

细胞衰老过程是细胞生理与生化反应发生变化的过程，主要表现是细胞对环境变化适应能力和维持细胞内环境恒定能力的降低。细胞衰老反映在细胞形态结构和功能上有很多变化，包括细胞内水分减少、色素生成和色素颗粒沉积、细胞质膜的流动性降低、磷脂含量降低、线粒体数量减少、蛋白质合成发生变化等。

有关衰老的学说很多，包括遗传程序说、体细胞突变论、自由基理论等。

细胞死亡有两种形式，一种为坏死性死亡，是由外部化学、物理或生物因素的侵袭而造成的细胞崩溃裂解；另一种为程序性细胞死亡，是细胞在一定的生理或病理条件下按照自身的程序结束其生存。

程序性细胞死亡与细胞坏死有3个根本的区别：①引起死亡的原因不同；②死亡的过程不同；③细胞坏死常引起炎症反应，而程序性死亡则不会引起炎症。

通过对秀丽隐杆线虫程序性细胞死亡的研究揭示程序性细胞死亡是由一系列的基因控制的，并发现所有的动物细胞中蛋白酶解级联系统介导了程序性细胞死亡。

程序性细胞死亡具有重要的生物学意义：参与形态建成、调节细胞的数量和质量。

癌细胞是一种突变的体细胞，这种突变体脱离了细胞社会关于增殖和存活的控制，因此可以无限增殖产生肿瘤。引起细胞癌变的因素很多，包括化学、辐射、病毒和遗传等。

从遗传上看，癌的发生涉及两类基因：肿瘤抑制基因和癌基因。肿瘤抑制基因编码的蛋白质抑制细胞生长，并阻止细胞癌变；癌基因编码的蛋白质使细胞生长不受控制，并促进细胞癌变。

参考文献

陈诗书，汤雪明. 1995. 医学细胞生物学与分子生物学. 上海：上海医科大学出版社

崔学增，徐学衡. 1995. 医学细胞生物学与遗传学. 北京：北京科学技术出版社

窦忠英，华进联. 2000. 胚胎干细胞的研究与应用. 动物医学进展，22 (1)：1～4

鄂征. 1996. 组织培养和分子细胞学技术. 北京：北京出版社

国家自然科学基金委员会. 1997. 自然科学学科发展战略调研报考：细胞生物学，北京：科学出版社

郝水. 1983. 细胞生物学. 北京：高等教育出版社

李采娟. 1992. 医学细胞生物学. 上海：上海医科大学出版社

鲁润龙，顾月华，1992. 细胞生物学. 合肥：中国科技大学出版社

汪德耀. 1998. 普通细胞生物学. 上海：上海科学技术出版社

汪堃仁，薛绍白，柳惠图主编. 1998. 细胞生物学（第二版）. 北京：北京师范大学出版社

翟中和主编. 1995. 细胞生物学. 北京：高等教育出版社

翟中和，王喜忠，丁明孝主编. 2000. 细胞生物学（第二版）. 北京：高等教育出版社

郑国锠. 1992. 细胞生物学（第二版）. 北京：高等教育出版社

Akey C W, and M Radermacher. 1993. Architecture of the Xenopus nuclear pore complex revealed by three-dimensional cryo-electron microscopy. J Cell Biol, 122：1～19

Alberts B, Bray D, Johnson A. *et al*. 1998. Essential Cell Biology, An Introduction to the Molecular Biology of the Cell. New York & London：Garland Publishing, Inc

Alberts B, Bray D, Lewis J *et al*. 1994. Molecular Biology of the Cell, 3rd ed. New York：Garland Publishing, Inc

Altmann M, and H Trachsel. 1993. Regulation of translation initiation and modulation of cellular physiology. Trends Biochem Sci, 18：429～432

Arscott P G, Lee G, Bloomfield V A, and Evans D F. 1989. Scanning tunnelling microscopy of Z-DNA. Nature, 339：484～486

Bcker W M, Kleinmith L J, Hardin J. 2000. The World of the Cell, 4th ed. San Francisco：The Benjamin/Cummings Publishing Company

Berridge M J. 1997. The AM and FM of calcium signalling. Nature, 386：759～760

Blancher M A, Hnllihen J, Pedersen P L, Amzel L M. 1998. The 280 Å structure of rat liver F_1-ATPase：configuration of a critical intermediate in ATP synthesis-hydrolysis. Proc Natl Acad Sci USA, 95：11065～11070

Bolsover S R *et al*. 1997. From Genes to Cells. John & Wiley Sons, Inc

Bozzola J J, and Russell L D. 1992. Electron Microscopy：Principles and Techniques for Biologists. Boston：Jones and Bartlett

Brandt U. 1997. Proton-translocation by membrane-bound NADH：ubiquinone-oxidoreduetase (complex I) through redox-gated ligand conduction. Biochim Biophys Acta, 1318：79～91

Bresnick A R. 1999. Molecular mechanisms of nonmuscle myosin-II regulation. Curr Opin Cell Biol, 11：26～33

Burridge K, and M Chrzanowska-Wodnicka. 1996. Focal adhesions, contractility, and signaling. Ann Rev Cell Dev Biol, 12：463～519

Butler P J G, and Klug A. 1978. The assembly of a virus. Sci Amer, 62

Cavenee W K, and R L White. 1996. The genetic basis of cancer. Sci Amer, 272：72～79

Chinnaiyan A M, K O'Rourke, B R Lane, and V M Dixit. 1997. Interaction of CED-4 with CED-3 and CED-9：a molecular framework for Cell death. Science, 275：1122～1126

Christofori G, and H Semb. 1999. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. Trends Biochem

Sci, 24: 73～76

Cooper D M F *et al*. 1995. Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling. Nature, 374: 421～424

Cooper G M. 2000. The Cell, a Molecular Approach. Washington: Sinauer Associates, Inc

Curtis D *et al*. 1995. Translational regulation in development. Cell, 81: 171～178

Davis L I. 1995. The nuclear pore complex. Annu Rev Biochem, 64: 865～896

de Duve C, and Beaufay H. 1981. A short history of tissue fractionation. J Cell Biol, 91: 293s～299s

Deisenhofer J, and J R Norris, eds. 1993. The Pbotosyntbetic Reaction Center. Academic Press. Vols. 1 and 2

Delmer D P, and Y Amor. 1995. Cellulose biosynthesis. Plant Cell, 7: 987～1000

Desai A, and T J Mitchison. 1997. Microtubule polymerization dynamics. Annu Rev Cell Dev Biol, 13: 83～117

Devaux P F. 1991. Static and dynamic lipid asymmetery in cell membranes. Biochem, 30: 1163～1173

Dowhan W. 1991. Phospholipid exchange proteins. Curr Opin Cell Biol, 3: 621～625

Doyle D *et al*. 1998. The structure of the potassium channel. Science, 280: 69～77

Draper D E. 1989. How do proteins recognize specific RNA sites? New clues from autogenously regulated ribosomal proteins. Trends Biochem Sci, 14: 335～338

Driever W, and C Nfisslein-Volhard. 1988. A gradient of bicoid protein in Drosophila embryos. Cell, 54: 83～93

Ellis H M, and H R Horvitz. 1986. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. Cell, 44: 817～829

Ellsas L J, and Longo N. 1992. Glucose transporters. Annu Rev Med, 43: 377～393

Fantl W J *et al*. 1993. Signaling by receptor tyrosine kinases. Annu Rev Biochem, 62: 353～381

Ferro-Novick S, and Jahn G. 1994. Vesicle fusion from yeast to man. Nature, 370: 191～193

Field C, R Li, and K Oegema. 1999. Cytokinesis in eukaryotes: a mechanistic comparison. Curr Opin Cell Biol, 11: 68～80

Flegler S L, Heckman J W, and Klomparens K L. 1993. Scanning and Transmission Microscopy: An Introduction. New York: Plenum

Franks E, and Mathias S E. (eds.) 1982. Biophysics of Water. New York: John Wiley & Sons Inc

Furukawa R, and M Fechheimer. 1997. The structure, function, and assembly of actin filament bundles. Int Rev Cytol, 175: 29～90

Gautier J *et al*. 1991. Cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates $p34^{cdc2}$. Cell, 67: 197～211

Georgatos S D *et al*. 1994. Lamins and lamin-associated proteins. Curt Opin Cell Biol, 6: 347～353

Golbeck J H. 1993. Shared thematic elements in photochemical reaction centers. Proc Natl Acad Sci USA, 90: 1642～1646

Goodson H V, C Valetti, and T E Kreis. 1997. Motors and membrane traffic. Curr Opin Cell Biol, 9: 18～28

Goody R S. 1994. How G proteins turn off. Nature, 372: 220～221

Gorlich D, and L W Marital. 1996. Nucleocytoplasmic transport. Science, 271: 1513～1518

Gould K L *et al*. 1991. Phosphorylation at Thr167 is required for Schizosaccharomyces pombe $p34^{cdc2}$ function. EMBO J, 10: 3297～3309

Green B R, Pichersky E, and Kloppstech K. 1991. Chlorophyll a/b-binding proteins: an extended family. Trends Biochem Sci, 16: 181～186

Hall A. 1998. Rho GTPases and the cytoskeleton. Science, 279: 509～514

Hankamer B, J Barber, and E Boekema. 1997. Structure and membrane organization of photosystem II from green plants. Ann Rev Plant Physiol and Plant Mol Biol, 48: 641～672

Hartwell L H *et al*. 1974. Genetic control of the cell division cycle in yeast. Science, 183: 46～51

Hayflick L. 1980. The cell biology of human aging. Sci Amer, 242: 58～65

Hegde R S, and Lingappa V R. 1997. Membrane protein biogenesis: Regulated complexity at the endoplasmic reticulum. Cell, 91: 575～582

Hemler M E. 1998. Integrin-associated proteins. Curr Opin Cell Biol, 10: 578～585

Heyting C. 1996. Synaptonemal complexes: Structure and function. Curr Opin Cell Biol, 8: 389～396

Higgins C F. 1992. ABC transporters: From microorganisms to man. Ann Rev Cell Biol, 8: 67～113

Hirokawa N. 1998. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. Science, 279: 519～526

Huber R. 1990. A structural basis of light energy and electron transfer in biology. Eur J Biochem, 187: 283～305

Huberman J A. 1999. DNA damage and replication checkpoints in the fission yeast, Schizosaccharomyces pombe. Progress Nucl Acid Res Mole Biol, 62: 369～395

Jacobson K *et al*. 1995. Revisiting the fluid mosaic model of membranes. Science, 268: 1441～1442

Jay D G. 1996. Role of band 3 in homeostasis and cell shape. Cell, 86: 853～854

Jentsch S. 1992. Ubiquitin-dependent protein degradation: a cellular perspective. Trends Cell Biol, 2: 98～103

Johnson A E. 1997. Protein translocation at the ER membrane: A complex process becomes more so. Trends Cell Biol, 7: 90～95

Jost J P, and Bruhat A. 1997. The formation of DNA methylation patterns and the silencing of genes. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 57: 217～248

Junge W, Lill H, and Engelbrecht S. 1997. ATP synthase: an electrochemical transducer with rota-tory mechanics. Trends Biochem Sci, 22: 420～424

Karp G. 1999. Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments, 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc

Kerr J E R, A H Wyllie, and A R Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Brit J Cancer, 26: 239～257

Khan S. 1997. Rotary chemiosmotic machines. Biochim Biophys Acta, 1322: 86～105

Kinosita K J *et al*. 1998. F_1ATPase: a rotary motor made of a single molecule. Cell, 93: 21～24

Kleinsmith L J, and Kish V M 1995. Principles of Cell and Molecular Biology, 2nd ed. Harper Collins College Publishers

Kornberg R D, and Lorch Y. 1992. Chromatin structure and transcription. Annu Rev Cell Biol, 8: 563～587

Koshland D, and Strunnikov A. 1996. Mitotic chromosome condensation. Annu Rev Cell Biol, 12: 305～333

Lamond A I, and Earnshaw W C. 1998. Structure and function in the nucleus. Science, 280: 547～553

Lewin B. 2000. Genes VII. New York: Oxford University Press Inc

Lichtman J W. 1994. Confocal microscopy. Sci Amer, 271 (August): 40～45

Lodish H, Berk A, Zipursky S L *et al*. 1999. Molecular Cell Biology, 4th ed. New York: W. H. Freeman and Company

Lodish H, Berk A, Zipursky S L *et al*. 1995. Molecular Cell Biology. New York & Oxford: Scientific American Books, Inc

Lufkin T. 1996. Transcriptional control of Hox genes in the vertebrate nervous system. Curr Opin Genet Devel, 6: 575～580

Maathuis J M, and Sanders D. 1992. Plant membrane transport. Curr Opin Cell Biol, 4: 661～669

Macmicking J *et al*. 1997. Nitric oxide and macrophage function. Annu Rev Immunol, 15: 323～350

Marshall I C B, and Willson K L. 1997. Nuclear envelope assembly after mitosis. Trends Cell Biol, 7: 69～74

McGough A. 1998. F-actin-binding proteins. Curr Opin Struct Biol, 8: 166～176

McLean B G, F D Hempel, and P C Zambryski. 1997. Plant intercellular communication via plasmodesmata. Plant Cell, 9: 1043～1054

Mellman I. 1996. Endocytosis and molecular sorting. Annu Rev Cell Biol, 12: 575

Menon A K. 1995. Flippases. Trends Cell Biol, 5: 355～360

Michel H, Behr J, Harrenga A, and Kannt A. 1998. Cytochrome c oxidase: structure and spectroscopy. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 27: 329～356

Mill A, and Branton D. 1996. Spectrin: on the path from structure to function. Curr Opin Cell Biol, 8: 49～55

Milstein C. 1980. Monoclonal antibodies. Sci Amer, 243 (October): 66～74

Montminy M. 1997. Transcriptional regulation by cyclic AMP. Annu Rev Biochem, 66: 807～822

Moore P B. 1988. The ribosome returns. Nature, 331: 223～227

Murata Y, and R P Wharton. 1995. Binding of Pumilio to maternal hunchback mRNA is required for posterior patterning in Drosophila embryos. Cell, 80: 747～756

Murray H L, and Jarrell K A. 1999. Flipping the switch to an active splieeosome. Cell, 96: 599～602

Nagata S. 1997. Apoptosis by death factor. Cell, 88: 355～365

Neer E J. 1995. Heterotrimeric G proteins: Organizers of transmembrane signals. Cell, 80: 249～257

Nelson DL, and Cox MM. 2000. Lehninger Principles of Biochemistry, 3rd ed. New York: Worth Publishers

Neueeld E F. 1991. *Lysosomal storage diseases*. Annu Rev Biochem, 60: 257～280

Nomura M. 1984. The control of ribosome synthesis. Sci Amer, 250: 102～114

Orr W C, and R S Sohal. 1994. Extension of life-span by overexpression of superoxide dismutase and catalase in Drosophila melanogaster, Science, 263: 1128～1130

Prince R. 1996. Photosynthesis: the Z-scheme revisited. Trends Biochem Sci, 21: 121～122

Rivera-Pomar R *et al*. 1995. *Activation of posterior gap gene expression in the Drosophila blastoderm*. Nature, 376: 253～256

Robinson M S *et al*. 1996. Membrane dynamics in endocytosis. Cell, 84: 13～21

Rogner M, Boekema E J, and Barber J. 1996. How does photosystem 2 split water? The structural basis of efficient energy conversion. Trends Biochem Sci, 21: 44～49

Rothman J E, and Wieland F T. 1996. Protein sorting by transport vesicles. Science, 272: 227～234

Rottenberg H. 1998. *The generation of proton electrochemical potential gradient by cytochrome c oxidase*. Biochim Biophys Acta, 1364: 1～16

Sachs G *et al*. 1995. The pharmacology of the gastric acid pump: The H^+/K^+-ATPase. Annu Rev Pharm, 35: 277～305

Schmid S L. 1997. Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting. Annu Rev Biochem, 66: 511～548

Schneider G, Y Lindqvist, and C I Branden. 1992. Rubisco: structure and mechanism. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 21: 119～153

Scott W G, and Klug A. 1996. Ribozymes: structure and mechanism in RNA catalysis. Trends Biochem Sci, 21: 220～224

Simon A M, and D A Goodenough. 1998. Diverse functions of vertebrate gap junctions. Trends Cell Biol, 8: 477～483

Staehelin L A, and Hepler P K. 1996. Cytokinesis in higher plants. Cell, 84: 821～824

Storrie B, and Desjardins M. 1996. The biogenesis of lysosomes. Bioess, 18: 895～903

Struhl G, P Johnston, and P A Lawrence. 1992. *Control of Drosophila body pattern by the hunchback morphogen gradient*. Cell, 69: 237～249

Thaler C D, and L T Haimo. 1996. Microtubules and microtubule motors: mechanisms of regulation. Int Rev Cytol, 164: 269～327

Thomas S M, and Brugge J S. 1997. Cellular functions regulated by Src family kinases. Annu Rev Cell Biol, 13: 513～609

Umplin D W, and Bloch R J. 1993. The membrane skeleton. Trends Cell Biol, 3: 113～117

Vaughn K C, and J D I Harper. 1998. Microtubule-organizing centers and nucleating site land plants. Int Rev Cytol, 181: 75～149

Vaux D L, and S J Korsmeyer. 1999. Cell death in development. Cell, 96: 245～254

Wade P A *et al*. 1997. Histone acetylation: Chromatin in action. Trends Biochem Sci, 22: 128～132

Walczak C E, and Mitchison T J. 1996. Kinesin-related proteins at mitotic spindle poles: Function and regulation. Cell, 85: 943～946

Weinert T. 1998. DNA damage checkpoints update: getting molecular. Curr Opin Genet Devel, 8: 185～193

Welch M D, A Mallavarapu, J Rosenblatt, and T J Mitchison. 1997. Actin dynamics in vivo. Curr Opin Cell Biol, 9: 54～61

Werb Z. 1997. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. Cell, 91: 439～442

Whiteheart S W, and Kubalek E W. 1995. SNAPs and NSF: General members of the fusion apparatus. Trends Cell Biol, 5: 64～68

Wilson D S, and Szostak J W. 1999. In vitro selection of functional nucleic acids. Annu Rev Biochem, 68: 611～648

Wolfe S J. 1993. Molecular and Cellular Biology. Belmont: Wadsworth Publishing Company

Wolffe A I *et al*. 1997. What do linker histories do in chromatin? Bioess, 19: 249～255

Yurchenco P D, and J C Schittny. 1990. Molecular architecture of basement membranes. FASEB J, 4: 1577～1590

Zuber H. 1986. Structure of light-harvesting antennna complexes of photosynthetic bacteria, cyanobacteria and red algae. Trends Biochem Sci, 11: 414～419

缩写表

AC	adenylate cyclase, 腺苷酸环化酶
ACTH	adrenocorticotrophic hormone, 促肾上腺皮质素
AFM	atomic force microscope, 原子力显微镜
ANT-C	antennapedia complex, 触角足复合物
AP	adaptin, 衔接蛋白
Apaf	apoptotic protease-activating factor, 凋亡蛋白酶激活因子
APC	anaphase-promoting complex, 促后期复合物
apoB	apolipoprotein B, 载脂蛋白 B
AQP	aquporin, 水通道蛋白
ARF	assembly reaction factor, 装配反应因子
ARS	autonomous replicating sequence, 自主复制序列
BR	Balbiani ring, 巴尔比亚尼环
CAK	Cdc2-activating kinase, Cdc2 激活蛋白激酶
CaM	calmodulin, 钙调蛋白
CAM	cell adhesion molecule, 细胞黏着分子
CAT	catalase, 过氧化氢酶
CBP	CREB-binding protein, CREB 结合蛋白
Cc	critical concentration, 临界浓度
CDK	cyclin-dependent protein kinase, 细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶
CE	*Caenorhabditis elegans*, 秀丽新小杆线虫
CEN	centromere, 着丝粒
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, 囊性纤维化跨膜传导调节蛋白
cGMP	cyclic guanosine monophosphate, 环鸟苷酸
CGN	*cis* Golgi network, 高尔基体内侧网络
CHIP	channel-forming integrate protein, 通道形成整合蛋白
CKI	cyclin-kinase inhibitor, 细胞周期蛋白-蛋白激酶抑制因子
c-onc	cellular oncogene, 细胞癌基因
COP I	coat protein I, 外被蛋白 I
COP II	coat protein II, 外被蛋白 II
CRE	cAMP response element, cAMP 效应元件
CREB	cyclic AMP response element binding factor, cAMP 效应元件结合因子

CURL	compartment of uncoupling of receptor and ligand, 受体与配体非偶联的区室
DFC	dense fibrillar component, 致密纤维组分
DHFR	dihydrofolate reductase, 二氢叶酸还原酶
DP	docking protein, 停靠蛋白
ECM	extracellular matrix, 细胞外基质
EDTA	ethylene diaminne tetraacetic acid, 乙二胺四乙酸
eEF	eukaryotic elongation factor, 真核延长因子
EGF	epidermal growth factor, 表皮生长因子
eIF	eukaryotic initiation factor, 真核起始因子
EPO	erythropoietin, 红细胞生成素
ER	endoplasmic reticulum, 内质网
ESC	embryonic stem cell, 胚胎干细胞
FAD	flavin adenine dinucleotid, 黄素腺嘌呤二核苷酸
FAK	focal adhesion kinase, 黏着斑激酶
FCM	flow cytometer, 流式细胞仪
Fd	ferredoxin, 铁氧还蛋白
FGF	fibroblast growth factor, 成纤维细胞生长因子
FMN	flavin mononucleotid, 黄素腺嘌呤单核苷酸
FN	fibronectin, 纤连蛋白
FRAP	fluorescence recovery after photobleaching, 荧光漂白恢复
GABAR	γ-aminobutyric acid receptor, γ-氨基丁酸受体
GAG	glycosaminoglycans, 糖胺聚糖
GalNAc	*N*-acetylgalactosamine, *N*-乙酰半乳糖胺
GalUA	galacturonic acid, 半乳糖醛酸
GAP	GTPase-activating protein, GTPase 激活蛋白
GC	guanylate cyclase, 鸟苷酸环化酶
GDI	guanine nucleotide-dissociation inhibitor, 鸟苷解离抑制蛋白
GEF	guanine nucleotide-exchange factor, 鸟苷交换因子
GH	growth hormone, 生长激素
GlcNAc	*N*-acetyglucosamine, *N*-乙酰葡萄糖胺
GLUT	glucose transporter, 葡萄糖运输蛋白
GNRP	guanine-nucleotide-releasing protein, 鸟嘌呤核苷释放蛋白
Grb	growth factor receptor-bound protein, 生长因子受体结合蛋白
GRE	glucocorticoid response element, 糖皮质激素效应元件
gRNA	guide RNA, 指导 RNA
GSH	glutathion, 谷胱甘肽
GSH-PX	glutathion-peroxidase, 谷胱甘肽过氧化物酶

HCI	heme-controlled inhibitor, 血红素控制的抑制剂
HDL	high density lipoprotein, 高密度脂蛋白
HGF	hepatocyte growth factor, 肝细胞生长因子
HGP	Human Genome Project, 人类基因组计划
HGPRT	hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase, 次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶
HMM	heavy meromyosin, 重酶解肌球蛋白
hnRNA	heterogeneous nuclear RNA, 不均一核 RNA
hnRNP	heterogeneous ribonucleoprotein, 异质核糖核蛋白
HPr	heat-stable protein, 热稳定蛋白
HSC	hematopoietic stem cell, 造血干细胞
Hsp	head shock protein, 热激蛋白
HSV	herpes simplex virus, 单纯疱疹病毒
HVEM	high-voltage electron microscope, 高压电子显微镜
Hylys	hydroxylysine, 羟赖氨酸
Iκ-B	inhibitor-κ binding, Iκ-B 抑制蛋白
I-CAM	intercellular adhesion molecule, 细胞间黏着分子
ICM	inner cell mass, 内细胞团
IDL	intermediate density lipoprotein, 中等密度脂蛋白
IF	intermediate filament, 中间纤维
IFAP	intermediate filament-associated protein, 中间纤维结合蛋白
IGF	insulin-like growth factor, 胰岛素样生长因子
IgSF	immunoglobulins superfamily, 免疫球蛋白超家族
IP_3	inosositol trisphosphate, 肌醇三磷酸
IRE	iron-response element, 铁效应元件
IRS	insulin receptor substrate, 胰岛素受体底物
KDEL	Lys-Asp-Glu-Leu, 赖氨酸-天冬氨酸-谷氨酸-亮氨酸
L-CAM	liver-cell adhesion molecule, 肝细胞黏着分子
LDL	low-density lipoprotein, 低密度脂蛋白
LECAM	leucocyte endothelial cell adhesion molecule, 白细胞内皮细胞黏着分子
LFA-1	leucocyte function-associated antigen 1, 白细胞功能相关抗原 1
LH	luteinizing hormone, 促黄体素
LHC II	light-harvesting complex II, 捕光复合物 II
LMM	light meromyosin, 轻酶解肌球蛋白
LN	laminin, 层黏连蛋白
MAP	microtubule-associated protein, 微管结合蛋白
MAPK	mitogen-activated protein kinase, 促分裂原活化蛋白激酶
MAR	matrix-associated region, 基质结合区

M-CSF	macrophage colony stimulating factor, 巨噬细胞集落刺激因子
MF	microfilament, 微丝
MHC	major histocompatibility complex, 主要组织相容性复合体
MLCK	myosin light china kinase, 肌球蛋白轻链激酶
MPF	maturation promoting factor, 促成熟因子
mRNP	messenger RNP, 信使 RNP
MT	microtubule, 微管
mtDNA	mitochondrion DNA, 线粒体 DNA
MTOC	microtubule organizing center, 微管组织中心
NA	noradrenalin, 去甲肾上腺素
nAchR	nicotinic acetylcholine receptor, 烟碱样乙酰胆碱受体
N-CAM	neural cell adhesion molecule, 神经细胞黏着分子
NES	nuclear export-signal, 核输出信号
NF-κ B	nuclear factor-κ-gene binding, κ基因结合核因子
Ng-CAM	neuroglia cell adhesion molecule, 神经胶质细胞黏着分子
NGF	nerve growth factor, 神经生长因子
NLS	nuclear localization signal, 核定位信号
NMR	nuclear magnetic resonance, 核磁共振
NOR	nucleolar organizing region, 核仁组织区
NPC	nuclear pore complex, 核孔复合体
NSC	neural stem cell, 神经干细胞
NSF	*N*-ethylmaleimide-sensitive fusion protein, *N*-乙基马来酰亚胺敏感融合蛋白
OMP	osmotic protein , 渗透蛋白
ORF	open reading frame, 可读框
PA	phosphatidic acid, 磷脂酸
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis, 聚丙烯酰胺凝胶电泳
PC	plastocyanin, 质体蓝素
PCC	premature chromosome condensation, 染色体超前凝聚
PCD	programmed cell death, 程序性细胞死亡
PCNA	proliferating cell nuclear antigen, 增殖细胞核抗原
PCR	polymerase chain reaction, 聚合酶链式反应
PDE	phosphodiesterase, 磷酸二酯酶
PDGF	platelet-derivedd growth factor, 血小板衍生生长因子
PE	phosphatidylethanolamine, 磷脂酰乙醇胺
PEG	polyethylene glycol, 聚乙二醇
PEP	phospholipid exchang protein, 磷脂交换蛋白
PG	proteoglycan, 蛋白聚糖

PGA	3-phosphoglycerate, 3-磷酸甘油酸
PGE	prostaglandin E, 前列腺素 E
Pheo	pheophytin, 褐藻素
PI	phosphatidylinositol, 磷脂酰肌醇
PIP_2	phosphatidylinositol biphosphate, 磷脂酰肌醇二磷酸
PI-PLC_β	phosphatidylinositol-specific phospholipase C_β, 磷脂酰肌醇特异的磷脂酶 C_β
PKA	protein kinase A, 蛋白激酶 A
PKC	protein kinase C, 蛋白激酶 C
PKG	protein kinase G, 蛋白激酶 G
PLA	phospholipase A, 磷脂酶 A
POMC	proopiomelanocortin, 阿黑皮素原
PQ	plastoquinone, 质体醌
PS	phosphatidylserine, 磷脂酰丝氨酸
PTK	protein tyrosine kinase, 蛋白酪氨酸激酶
PX	peroxidase, 过氧化物酶
Ras	rat sarcoma, 大鼠肉瘤
RB	retinoblastoma, 成视网膜细胞瘤
RCC1	Ran nucleotide-exchange factor 1, Ran 核苷交换因子 1
RER	rough endoplasmic reticulum, 糙面内质网
RF	release factor, 释放因子
RFLP	restriction fragment length polymorphism, 限制性片段长度多态性
RGD	arginine-glycine-aspartic acid, 精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸
R_i	inhibit receptor, 抑制型受体
R_s	stimulate receptor, 激活型受体
RSV	Rous sarcoma virus, 劳氏肉瘤病毒
RTK	receptor tyrosine kinase, 受体酪氨酸激酶
rubisco	ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase-oxygenase, 核酮糖 1, 5 -二磷酸羧化酶加氧酶
RuBP	ribulose-1, 5-biophosphate, 核酮糖 1, 5 -二磷酸
SAR	scaffold-associated region, 支架结合区
SARS	severe acute respiratory syndrome, 严重急性呼吸综合征
SC	stem cell, 干细胞
scRNA	small cytoplasmic RNA, 细胞质小 RNA
SDS	sodium dodecyl sulfate, 十二烷基硫酸钠
SEM	scanning electron microscope, 扫描电子显微镜
SER	smooth endoplasmic reticulum, 光面内质网
SH	src homology domain, src 同源结构域
SMC	structural maintenance of chromosome, 染色体结构维持

SNAP	soluble NSF attachment protein, 可溶性 NSF 附着蛋白
SNRE	SNAP receptor , SNAP 受体
snRNA	small nuclear RNA, 细胞核小 RNA
snRNP	small nucleolar ribonucleoprotein, 小核糖核蛋白
SOD	superoxide dismutase, 超氧化物歧化酶
SPF	S phase-promoting factor, 促 S 期因子
SR	sarcomere, 肌节
Src	sarcoma, 肉瘤
SRE	extracellular signal regulated kinase, 细胞外信号调节蛋白激酶
SRF	serum response factor 血清效应因子
SRP	signal recognition partical, 信号识别颗粒
STEM	scanning transmission electron microscope, 扫描透射电子显微镜
STM	*scanning tunneling microscope*, 扫描隧道显微镜
TEL	telomere, 端粒
TEM	transmission electron microscope, 透射电子显微镜
TGN	*trans* Golgi network, 高尔基体外侧网络
TK	thymidine kinase 胸腺嘧啶激酶
TM	tropomyosin, 原肌球蛋白
Tn	troponin, 肌钙蛋白
TNF	tumor necrosis factor, 肿瘤坏死因子
TSC	totipotent stem cell, 全能干细胞
TSH	thyrotrophic hormone, 促甲状腺激素
T-SNRE	target-SNAP receptor, 靶 SNAP 受体
UQ	ubiquinone, 辅酶 Q
V-CAM	vascular cell adhesion molecule, 血管细胞黏着分子
VEGF	vascular endothelial growth factor, 血管内皮生长因子
VLDL	very low-density lipoprotein, 极低密度的脂蛋白
v-onc	viral oncogene, 病毒癌基因
V-SNRE	vesicle-SNAP receptor, 小泡 SNAP 受体
VSV	vesicular stomatitis virus, 水泡性口炎病毒
WHO	the World Health Organization, 世界卫生组织
YAC	yeast artificial chromosome, 酵母人工染色体
ZAP	zone of polarizing activity, 极性激活带
γ-TuRC	*γ-tubulin ring complex*, γ 微管蛋白环状复合体

中文索引

ABC 运输蛋白 116
ATP 合酶 290
A 带 444
A 位点 240
cAMP 效应元件 196
Ca^{2+}-钙调蛋白依赖性蛋白激酶 206
Cdc13 蛋白 522
Cdc2 蛋白 521
Cdc2 活化蛋白激酶 522
CDK 抑制蛋白 602
CF_0-CF_1 ATP 酶复合体 326
cGMP 依赖性蛋白激酶 G 208
COPII 被膜小泡 398
COPI 被膜小泡 398
C 带 498
D-半乳糖 83
D-甘露糖 83
D-葡萄糖 83
DNA 合成期 510
DNA 甲基化 570
DNA 修复蛋白 620
DNA 重排 570
E 位点 240
F 型泵 115
F-肌动蛋白 433
Grb2 蛋白 217
GTPase 激活蛋白 187
GTP 结合蛋白 186
GU-AG 规则 256
G 带 498
G 蛋白偶联受体 174
G 蛋白循环 186
G-肌动蛋白 433
II 型糖原贮积病 387
II 组内含子 257
I 带 444
I 细胞病 385
I 组内含子 257
L-岩藻糖 83
M6P 受体蛋白 382
M 蛋白 22
M 期 509
N-糖基化 364
N-乙酰-D-半乳糖胺 83
N-乙酰葡萄糖胺 83
N-乙基马来酰亚胺敏感融合蛋白 405
N-乙酰葡萄糖胺 382
N-乙酰葡萄糖胺磷酸转移酶 382
NADH 脱氢酶 287
$NADP^+$ 还原酶 320
Na^+/K^+ 泵 117
NO 合酶 219
N 带 499
N 端规则 249
PKA 系统 188
PKC 系统 198
P 位点 240
P 型泵 115
Q 带 498
Ran 核苷交换因子 1 469
Ras 蛋白 215
RNA 编辑 258
RNA 剪接 256
RuBP 羧化酶 329
R 带 499
scRNA 250
SH 结构域 212
snRNA 250
Src 同源结构域 213
S 蛋白 22
Triton X-100 414
T 带 499
V 型泵 115
X 射线衍射 47
X 失活 488
Z 线 445
α 银环蛇毒素 176
α 辅肌动蛋白 445
α 连环蛋白 159
α 螺旋颈区 441
α 微管蛋白 415
β 连环蛋白 159
β 微管蛋白 415
β-内酰胺酶 358
β-葡糖脑苷脂酶 386
γ-氨基丁酸受体 175
γ 微管蛋白环复合体 418
阿黑皮素原 578
埃 7
癌 611
癌基因 618
氨基蝶呤 55
氨甲蝶呤 276
氨酰 tRNA 240
暗反应 328
暗视野显微镜 36
巴尔比亚尼环 469
巴氏小体 488
白色体 305
白血病 611
百日咳 196
百日咳毒素 197
斑点黏着 161
斑块 158
斑块连接 157
斑马鱼 578
半桥粒 160
半乳糖基转移酶 390
半乳糖氧化酶 95
半寿期 249
半透性 70
半透性的 107
半纤维素 126
半自主性细胞器 333

伴肌动蛋白 446
包含体 473
包埋 37
孢子减数分裂 540
胞壁质 130
胞吃作用 392
胞间连丝 163
胞内运输 103
胞吐作用 387
胞吞作用 120
胞饮作用 392
胞质分裂 534
胞质环 463
胞质环流 451
胞质膜 70
胞质溶胶 340
胞质溶胶面 350
饱和性 180
保卫细胞 206
爆发集落形成单位 589
背腹轴 580
被动运输 103
被膜 307
泵 104
编辑体 259
鞭毛 429
扁平膜囊 366
变态 578
变形虫 392
变形运动 451
遍在蛋白连接酶 517
遍在蛋白缀合酶 517
表面受体 172
表皮生长因子 211
丙酮酸脱氢酶 277
病毒癌基因 619
卟啉环 317
捕光复合物 317
捕光色素 316
布雷菲德 A 370
糙面内质网 349
草酰乙酸 308,332
侧向扩散 96
层黏连蛋白 143
层析 59
差别基因表达 569
差示光谱 285
差速离心 57
常染色质 487
超薄切片 42
超极化 210
超家族 455
超螺线管 493
超螺旋环 493
超微结构 39
超氧化物歧化酶 599
巢蛋白 144,586
成斑 98
成虫盘 579
成对碱性氨基酸蛋白酶 390
成骨干细胞 588
成骨细胞 589
成核 418
成肌细胞 589
成帽 98
成软骨细胞 589
成视网膜细胞瘤蛋白 601
成熟 21
成体干细胞 585
成纤维细胞 133,589
成纤维细胞生长因子 211
成脂肪细胞 589
程序性细胞死亡 602
持家基因 568
重叠带 536
重复序列 478
重组 DNA 61
重组节 542
重组期 542
初固定 37
初级电子受体 319
初级分选站 367
初级内体 385
初级胚胎诱导 563
初级溶酶体 377
初级细胞板 534
初级主动运输 119
初生细胞壁 129
触角足复合物 584
穿梭受体 467
雌配子 551
次黄嘌呤 55
次级内体 385
次级溶酶体 377
次级主动运输 119
次生细胞壁 129
次缢痕 497
刺激型受体 192
粗肌丝 444
粗线期 542
促 S 期因子 524
促癌的癌基因 619
促成熟因子 511
促分裂原 520
促分裂原活化蛋白激酶 202
促后期复合物 517
促进扩散 108
窜扰 225
催化结构域 209
催化受体 177
错误成灾论 595
大单拷贝区 334
大沟 46
代谢偶联 164
带 3 蛋白 76
带 4.1 蛋白 77
带型 498
单胺氧化酶 266
单倍体配子体 540
单层 612
单次跨膜受体 179
单颗粒示踪 100
单克隆抗体 54
单能 561
单能干细胞 585
单体 416
单体 GTP 结合蛋白 403
单体隔离蛋白 439
单位膜模型 90
单向转运 116
单一序列 478
胆固醇 79
弹性蛋白 142
弹性纤维 142
蛋白激酶 C 198

蛋白聚糖 134
蛋白酶体 249
蛋白质分选 270
蛋白质寻靶 270
蛋白质运输 270
蛋白质转运通道 359
导向信号 271
导向序列 271
灯刷染色体 499
等密度离心 57
等渗的 107
低密度脂蛋白 394
低渗的 107
地址签 344
第二信使 185
第一信使 185
电磁透镜 40
电化学梯度 288
电激 66
电偶联 164
电生成 288
电视显微镜 414
电位闸门通道 109
电子枪 40
电子显微镜 39
电子载体 282
凋亡蛋白酶激活因子 609
凋亡小体 604
顶体 380,555
顶体反应 555
顶体突 556
动基体 258
动力蛋白 425
动力敏感闸门通道 109
动粒 496
动态不稳定 422
动物极 553
动作电位 448
毒蝇碱性乙酰胆碱受体 187
端化 542
端粒序列 478
端着丝粒染色体 496
短杆菌肽 A 105
堆积类囊体 310
对控基因 583
多遍在蛋白化作用 517
多发性结肠腺癌基因 617
多精受精 557
多聚核糖体 245
多能干细胞 585
多能细胞 561
多态性 477
多糖 12
多萜醇磷酸 364
多线染色体 499
多亚基受体 179
恶性细胞 612
二倍体孢子体 540
二价体 542
二羧酸交换载体 308
二酰甘油 185
二硝基苯胺 422
发动蛋白 400
发动机蛋白 425
翻译后转运 269
翻译控制 575
翻译抑制物 580
翻转 97
翻转扩散 97
翻转酶 97,353
反式作用因子 486
反向重复 334
反向转运 116
反义 RNA 251
反应中心复合物 317
纺锤极体 417
纺锤体 533
纺锤体赤道 533
放大率 33
放射辐条 430
放射性 616
放射性标记法 95
放射自显影 38
非堆积类囊体 310
非循环式电子传递途径 324
非循环式光合磷酸化 327
非整倍性 613
非组蛋白 483
分辨极限 33
分辨率 32
分化 550
分节 578
分裂间期 543
分裂期 509
分泌途径 342
分子伴侣 471
分子发动机 414
分子内伴侣 473
分子生物学 3
分子细胞生物学 4
缝合蛋白 157
浮力密度离心 59
辐条 463
抚育细胞 553
辅基蛋白 B-100 394
辅酶 Q 283
负端 417
负染色 43
负选择标记 66
附着层 452
附着蛋白 85
复合物 I 287
复合物 II 287
复式显微镜 34
复制 21
副节 583
钙调蛋白 205
钙结合糖蛋白 144
钙黏着蛋白 151
干涉 35
干细胞 585
甘露糖 6-磷酸 381
甘油-磷酸穿梭 281
肝素 134
肝细胞 133
肝细胞生长因子 211
高尔基体内侧网络 367
高尔基体外侧网络 367
高甘露糖寡聚糖 371
高渗的 107
高速泳动族蛋白 483
高压电子显微镜 42
革兰氏阳性 130
革兰氏阴性 130
个体发育 550

共翻译转运 270
沟 445
构架 412,504
古细菌 15
骨骼肌 444
骨髓间质干细胞 588
关卡 527
光合电子传递链 319
光合电子转移反应 315
光合磷酸化 325
光合作用 314
光呼吸 330
光解作用 322
光面内质网 349
光吸收色素 316
光系统 317
光系统 II 复合物 320
光系统 I 复合物 322
光学显微镜 29
光子 315
硅肺 386
鬼笔环肽 437
滚环复制 234
果胶 126
果蝇 578
过氧化氢酶 301,599
过氧化物酶体 299
合胞体 580
合子基因 582
合子减数分裂 540
核被膜 462
核被膜格 463
核磁共振 49
核蛋白 466
核定位信号 466
核骨架 503
核基质 461,503
核剪接 256
核孔复合体 463
核孔运输 345
核酶 24
核内有丝分裂 499
核仁基质 502
核仁相随染色质 502
核仁周期 502
核仁组织区 497
核输出信号 467
核酸酶超敏感位点 489
核糖醇 131
核糖核酸酶 P 254
核糖体 229
核糖体蛋白质 231
核糖体重组 238
核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶加氧酶 311
核纤层 462
核小体 488
核小体组蛋白 481
核心蛋白 134
核型 497
核运输系统 467
核质 461
核质蛋白 467
核质环 463
核周腔 463
盒式机制 570
褐藻素 321
横桥 537
横小管 448
红细胞 72
红细胞膜骨架 75
后部形态发生素 580
后期 533
后期 A 535
后期 B 535
呼吸活化肽 555
呼吸链 281
琥珀酸 308
琥珀酸脱氢酶 287
滑动丝模型 447
化学渗透假说 292
踝蛋白 146
坏死 600
黄曲霉毒素 B 616
黄素蛋白 280
混合功能氧化酶 354
获能 556
霍乱 196
霍乱毒素 196
机械化学酶 441
肌醇三磷酸 185
肌动蛋白 76
肌动蛋白纤维 432
肌动蛋白纤维去聚合蛋白 439
肌动球蛋白 444
肌钙蛋白 445
肌干细胞 588
肌腱蛋白 144
肌节 444
肌联蛋白 446
肌膜 444
肌球蛋白 425
肌收缩 444
肌纤维 444
肌原纤维 444
肌质网 448
基粒 310
基粒类囊体 310
基膜 144
基态 315
基体 416,431
基因操作 61
基因调控蛋白 484
基因工程 61
基因克隆 62
基因扩增 233
基因剔除 64
基因组 477
基因组控制 570
基质(ground substance) 134
基质(matrix) 264
基质(stroma) 305
基质导向序列 272
基质结合区 27,505
基质类囊体 310
基质片层 310
激发态 315
激活期 605
激素 169
级联 184
极低密度的脂蛋白 394
极粒 562
极体 553
极细胞 580
极性 436,578
极性激活带 565

极叶 562
极质 562
集落形成单位 589
嵴 264
加帽蛋白 436
加速电压 40
荚膜 131
假尿苷 235
间充质细胞 560
间隔区 253
间期 509
间隙连接 163
兼性异染色质 487
拣出 150
减数分裂 531
剪接体 15,256
简单扩散 107
交叉 542
交叉端化 545
交联蛋白 439
交联剂 181
交联桥 447
胶原 136
胶原纤维 139
胶原原纤维 139
焦距 31
角孔径 31
接触点 271
接触抑制 53,612
接合器 400
结肠癌 617
结构域 14
结合蛋白 556
结合改变模型 293
解毒 354
金属结合蛋白 312
紧密连接 157
近端着丝粒染色体 496
精母细胞 554
精细胞 540
精原细胞 553
精子 551
精子发生 553
精子细胞 540
景天酸代谢 332
局部介质 170
巨噬细胞 378
巨噬细胞集落刺激生长因子 211
巨形线粒体 262
巨型染色体 499
聚光镜 34,40
聚合酶链式反应 63
聚乙二醇 54
卷轴模型 491
决定子 85
卡尔文循环 329
抗凋亡蛋白 620
抗霉素 288
抗生素 246
抗氧化剂 599
颗粒区 501
可交换位点 415
可逆性 180
可溶性 NSF 附着蛋白 405
跨膜蛋白 85
跨膜运输 345
喹吖因 498
醌 283
扩散 106
扩展 452
蓝绿藻 16
蓝细菌 15
劳氏肉瘤病毒 619
老年斑 600
酪氨酸激酶偶联受体 177
类固醇激素 170
类胡萝卜素 317
类囊体 307
类囊体腔 310
类驱动蛋白 426
冷冻断裂复型 44
冷冻蚀刻技术 44
离子交换层析 61
离子通道 109
离子通道偶联受体 174
离子运载离子载体 105
离子载体 105
连环蛋白 154
连接蛋白 164
连接区 DNA 488
连丝微管 165
连续细胞系 53
联会 542
联会复合体 542
良性肿瘤 617
两亲性的 78
亮氨酸拉链基序 484
裂片 434
临界浓度 420
淋巴瘤 611
淋巴因子 170
磷壁酸 131
磷酸二酯酶 196
磷酸甘油醛 308
磷酸甘油酸 329
磷酸甘油酸激酶 14
磷酸化运输 120
磷酸交换载体 308
磷酸酪氨酸基序 212
磷酸酰胺 422
磷酸乙醇酸 330
磷脂 78
磷脂交换蛋白 353
磷脂酶 96
磷脂酶 C_β 198
磷脂酰肌醇 199
磷脂酰肌醇二磷酸 198
磷脂酰肌醇特异的磷脂酶 C_β 198
磷脂酰肌醇信号途径 197
磷脂酰丝氨酸 605
磷脂转运蛋白 353
流动镶嵌模型 91
流动性 96
流式细胞仪 49
硫酸角质素 134
硫酸皮肤素 134
硫酸软骨素 134
硫酸乙酰肝素 134
瘤 611
笼状体 463
滤泡细胞 552
卵 551
卵黄被 553
卵黄高磷蛋白 552
卵黄生成素 552

卵黄小体 552
卵黄脂磷蛋白 552
卵裂 560
卵母细胞 552
卵鞘 580
卵原细胞 552
卵子发生 551
螺线管 493
螺旋-环-螺旋基序 485
螺旋-转角-螺旋基序 484
脉冲追踪实验 347
毛地黄皂苷 265
毛绿蛋白 450
锚定蛋白 77
锚定连接 159
酶联受体 174
酶联受体信号传导 208
酶细胞化学 47
酶效应组装 15
酶原 384,607
密度依赖性生长抑制 612
免疫电镜 48
免疫球蛋白超家族 155
免疫细胞化学 48
免疫荧光 48
模板组装 15
膜 70
膜不对称性 93
膜蛋白 85
膜间间隙 264
膜间间隙导向序列 272
膜结合蛋白 440
膜结合核糖体 269
膜结合机器 188,189
膜结合区室 339
膜结合细胞器 339
膜结合型 GC 209
膜片钳 187
膜糖 82
膜运输 339
膜运输蛋白 104
膜脂 78
膜重建 105
末端阻断蛋白 439
末期 533
母体基因 580
母体信息 558
木瓜蛋白酶 442
木质素 126
内部信号序列 362
内分泌信号传导 170
内共生学说 298
内含子 253
内核膜 462
内膜 70,264
内膜系统 340
内胚层 560
内胚层干细胞 588
内收蛋白 77
内体 385
内吞途径 342
内吞作用 377
内细胞团 66,586
内源酶促活性受体 177
内在蛋白 85
内质网 348
内质网滞留信号 369
囊性纤维化跨膜传导调节蛋白 65
拟核 4
拟基因 236
拟南芥 578
拟液态 101
逆向运输 428
黏蛋白 155
黏脂病 386
黏着斑 159
黏着斑蛋白 147
黏着斑激酶 147
黏着带 159
黏着蛋白 132
黏着连接 159
鸟苷交换因子 187
鸟苷解离抑制蛋白 187
鸟苷酸环化酶 209
鸟嘌呤核苷释放蛋白 402
尿酸氧化酶 302
凝集素 84,152
凝胶过滤层析 60
凝胶-溶胶 451
凝聚蛋白 531
凝聚期 541
凝溶胶蛋白 222,446,608
浓缩泡 366
偶联因子 1 289
偶联转运 116
偶线期 542
旁分泌信号传导 170
胚孔 560
胚胎干细胞 66
胚胎生殖细胞 586
胚胎诱导 563
胚状体 587
配对期 542
配体 110,172,392
配体结合结构域 209
配体闸门通道 110
配子发生 551
配子减数分裂 539
喷镀 43
膨胀 107
披网格蛋白小泡 398
皮层反应 555
皮质颗粒 553
片层结构模型 90
片状 420
片状伪足 452
嘌呤霉素 247
苹果酸-天冬氨酸穿梭 281
苹果酸 308
破坏框 517
葡萄糖聚合酶 201
葡萄糖载体 309
起始 241,524
起始因子 241
起始者 607
起始转移信号 361
牵张闸门通道 110
前白蛋白 390
前蛋白 390
前蛋白质 357
前导肽 271
前后轴 580
前胶原 139
前列腺素 170
前期 532

前肽 357
前胰岛素原 372
前原胶原 138
前质体 305
羟基化 365
桥粒 160
桥粒斑蛋白 161
桥粒芯蛋白 161
桥粒芯胶黏蛋白 161
鞘氨醇 78
鞘脂 78
亲和标记 105,181
亲和层析 60
侵入 21
轻酶解肌球蛋白 442
秋水仙素 421
区室 339
驱动蛋白 425
趋同 223
趋异 224
去垢剂 87
去酪氨酸酶 421
去组装 416
全能干细胞 585
全能性 561
缺口基因 582
染色 38
染色粒 499
染色体 477
染色体超前凝聚 515
染色体分带 498
染色体分选 50
染色体骨架 504
染色体结构维持 531
染色质 477
热激反应 476
人成纤维细胞 592
人工染色体 481
人类基因组计划 62
绒毛蛋白 450
绒毛膜 580
溶胶-凝胶 451
溶酶体 373
溶酶体贮积病 385
融合蛋白 391
融合孔 391
三联体 416
扫描电子显微镜 40
扫描隧道显微镜 45
扫描透射电子显微镜 41
色素 316
色素细胞 589
上调 192
上皮 560
奢侈基因 568
伸展蛋白 128
神经递质 171
神经干细胞 586
神经嵴干细胞 589
神经生长因子 211
神经细胞黏着分子 150
神经酰胺 79
神经信号传导 171
肾上腺素 196
肾上腺素能受体 196
渗透 106
渗透压计 18
升降臂 447
生长 550
生长因子 170
生长因子受体 620
生存因子 608
生化合成途径 341
生活史 578
生理效应 180
生物发生 233
生物分子 8
生物膜 70
生物膜体系 19
生殖细胞 26
绳珠结构 489
识别螺旋 484
实验细胞学 3
始端减数分裂 540
视网膜干细胞 588
释放 21
释放因子 244
收缩 107
收缩环 534
受精作用 555
受体 172
受体减量调节 226
受体交叉 179
受体介导的内吞作用 392
受体酪氨酸激酶 177,178,210
输出蛋白 467
输入蛋白 467
数值孔径 32
衰老 591
衰老基因 595
衰老相关基因 595
双分子层 80
双联体 416
双酸性分选信号 404
双筒显微镜 34
双线期 542
双胸复合物 584
双胸突变 574
双折光带 444
水裂解反应 322
水泡性口炎病毒 370
水溶性信息 169
水通道蛋白 112
顺式作用元件 486
顺向运输 428
丝分裂器 534
死亡结构域 609
死亡受体 608
死亡信号 605
饲喂细胞 586
饲养层 586
速度离心 57
酸性水解酶 374
随机重复 334
随体 497
羧肽酶 390
踏车 422
肽聚糖 130
肽酰 tRNA 位点 240
肽酰转移酶 243,254
碳固定反应 315
碳酸酐酶 73
糖胺聚糖 134
糖蛋白 128,364
糖萼 84,124

糖基磷脂酰肌醇 86
糖酵解 277
糖皮质(激)素受体 477
糖皮质激素 174
糖异生 196
糖脂 79
套索 257
特异性 179
剔除小鼠 64
体节 583
体节基因 582
体节极性基因 583
体细胞 26
体细胞突变论 595
天线复合物 320
调节型分泌途径 389
条件突变体 513
铁-硫中心 283
铁结合转铁蛋白 396
铁硫蛋白 283
铁效应元件 576
铁氧还蛋白 320
停靠蛋白 358
通道蛋白 109
通道形成离子载体 105
通讯连接 157
同步化 512
同向转运 116
同源钝化 226
同源染色体 542
同源异型基因 571
同源异型结构域 574
同源异型框 574
同源异型框蛋白 574
投射镜 40
透明带 553
透明质酸 134
透射电子显微镜 40
透性酶 109
吞噬体 377
吞饮作用 392
脱氨酰 tRNA 240
脱分化 567
脱铁转铁蛋白 396
唾液酸 83
唾液酸转移酶 390
外被蛋白 II 398
外被体 398
外核膜 462
外膜 264
外胚层 560
外显子 253
外质 451
外周蛋白 85
弯曲 97
网格蛋白 400
网格蛋白被膜小窝 401
微管 415
微管蛋白 415
微管滑动模型 431
微管结合蛋白 423
微管连接蛋白 430
微管组织中心 417
微粒体 348
微绒毛 433,450
微丝 432
微体 299
维管束鞘细胞 332
伪足 451
位置效应 487
位置信息 564
温度 101
稳定期 434
物镜 40
吸附 21
吸附内吞 392
细胞 1
细胞癌基因 619
细胞包被 130
细胞被 124
细胞表面 124
细胞凋亡 602
细胞分裂 531
细胞分裂周期 513
细胞分泌 387
细胞分选 49
细胞工程 51
细胞骨架体系 19
细胞核 461
细胞化 584
细胞化学 3,47
细胞决定 561
细胞连接 156
细胞膜 70
细胞内受体 172
细胞黏着 148
细胞黏着分子 153
细胞爬行 451
细胞培养 51
细胞谱系 584
细胞融合 54
细胞色素 283
细胞色素 c 氧化酶 287
细胞社会学 27
细胞生理学 3
细胞生物学 1
细胞识别 148
细胞衰老 591
细胞松弛素 B 437
细胞通讯 167
细胞外基质 132
细胞外信号调节激酶 202
细胞系 53
细胞信号传导 168
细胞学说 2
细胞遗传学 3
细胞因子 27
细胞运输 103
细胞质 4
细胞质斑 159
细胞质动力蛋白 427
细胞质决定子 562
细胞质膜 70
细胞质膜系统 339
细胞周期 508
细胞周期蛋白-蛋白激酶抑制因子 529
细胞周期蛋白 517
细胞周期蛋白 B 517
细胞周期蛋白依赖性激酶 516
细胞周期控制蛋白 620
细胞株 53
细肌丝 444
细菌 16
细菌视紫红质 120
细丝蛋白 449

细线期 541
下调 192
纤连蛋白 142
纤连蛋白受体 146
纤毛 429
纤毛动力蛋白 431
纤丝 412
纤维切割蛋白 439
纤维素 126
纤维网络 136
纤维中心 501
衔接蛋白 398
显微操作 55
显微分光光度术 48
显微结构 33
线虫 578
线粒体 261
线粒体 DNA 294
线粒体基粒 266
线粒体基质蛋白 271
线粒体损伤论 595
限制点 520
腺苷酸环化酶 190
腺苷酸激酶 267
相变 96
相变温度 101
相差显微镜 35
向内运输 428
向外运输 428
小 GTP 结合蛋白 405
小单拷贝区 334
小沟 46
小泡运输 345
小窝 393
效应物 189
协同转运 119
缬氨霉素 105
心房钠尿肽 209
心磷脂 266
锌指结构基序 484
信号斑 382
信号传导蛋白 211
信号传导复合物 211
信号分子 169
信号级联放大 184
信号假说 357
信号识别颗粒 358
信号肽 271
信号肽酶 359
信号序列 271,356
信号转导 168,182
信号转导蛋白 620
星形细胞瘤 617
形成面 367
形态发生 134,550
形态发生素 564
胸腺嘧啶 55
雄配子 551
雄性原核 557
休克 387
旋转 97
旋转升降臂 447
选择蛋白 154
选择同步化 512
选择者基因 583
血管内皮生长因子 211
血凝素-酯酶 22
血清白蛋白 390
血纤蛋白原 148
血小板生长因子 211
血型糖蛋白 A 76
血影 73
血影蛋白 76
循环式电子传递途径 324
循环式光合磷酸化 328
亚显微结构 39
亚中着丝粒染色体 496
烟碱样乙酰胆碱受体 175
延长 418
延胡索酸 308
延伸 242
掩蔽 mRNA 576
氧化磷酸化 288
氧化酶 300
氧还电位 283
氧还对 283
氧释放复合物 322
叶绿醇 317
叶绿素 316
叶绿体 304
叶绿体膜 306
叶肉细胞 332
液泡 376
液相内吞 392
胰岛素 211
胰岛素受体 212
胰岛素受体底物 212
胰岛素样生长因子 1 211
胰岛素原 372
胰凝乳蛋白酶 442
移动蛋白 166
移动区带离心 58
遗传程序论 595
遗传信息表达体系 19
乙醛酸循环体 299
异固缩 487
异核体 54
异染色质 487
异噬性溶酶体 377
异体吞噬 377
异养生物 304
异源钝化 226
异源三体 G 蛋白 186
异质的 373
抑制蛋白 222
引发体 15
应力纤维 449
荧光漂白恢复 99
荧光素 98
荧光显微镜 34
蛹化 579
游离核糖体 269
有色体 305
有丝分裂 531
有限细胞系 53
幼虫 579
诱导同步法 512
宇宙射线 616
愈伤组织 53,567
原癌基因 619
原肠胚 560
原代培养 52
原核融合 555
原核细胞 15
原肌球蛋白 76,445

原肌球调节蛋白 445
原胶原 137
原生质 2
原生质体 3
原始生殖细胞 551
原纤维 415,456
原子力显微镜 46
圆球体 376
运动性 96
运输小泡 345,388
载体蛋白 111
载脂蛋白 B 259
再分化 567
再凝聚期 542
再生 568
早老症 596
早中期 533
造血干细胞 588
增殖期 551
增殖细胞核抗原 528
闸门通道 109
张力丝 456
胀泡 469
照相系统 40
蔗糖密度梯度离心 58
真核起始因子 2 576
真核细胞 17
真空系统 40
真细菌 15
整合蛋白 85
整联蛋白 145
正端 417
正选择标记 65
支持细胞 553
支架 412
支架结合区 505
支原体 7
肢芽 564
脂肪细胞 353
脂连接蛋白 86
脂锚定蛋白 86
脂溶性信使 169
脂双层 74
脂酰 CoA 404
脂质体 82
执行期 605
执行者 607
植物极 553
植物细胞工程 28
植物组织培养 53
指导 RNA 259
制动器 618
质壁分离 106
质体 305
质体醌 320
质体蓝素 312
质子动势 288
致密纤维组分 501
中国仓鼠卵巢细胞 370
中间层 129
中间减数分裂 540
中间镜 40
中间纤维 454
中间纤维结合蛋白 456
中膜体 16
中胚层 560
中期 533
中心粒 416
中心粒旁基质 417
中心体 417
中心体循环 535
中性粒细胞 378
中央运输蛋白 463
中着丝粒染色体 496
终变期 542
终端减数分裂 539
终止 225
终止转移肽 362
终止转运信号 362
肿瘤坏死因子 608
肿瘤抑制基因 618
重链结合蛋白 363
重酶解肌球蛋白 442
周质区 451
周质网 307
轴丝 429
轴突运输 428
轴质 426
潴泡面 350
主动运输 103
主缢痕 495
专一化 561
转氨酶 302
转胞吞作用 393
转胞吞作用 396
转导素 209,210
转决定 567
转录单位 234
转录激活物 580
转录控制 571
转录抑制复合物 RNA 251
转录抑制物 580
转录因子 620
转铁蛋白 396
转位 243
转细胞运输 103
转移 614
转运蛋白 272
转运肽 271
转运肽酶 271
装配反应因子 401
锥虫 258
着丝粒 495
着丝粒序列 478
紫杉醇 421
自分泌信号传导 171
自剪接 254
自磷酸化 212
自溶 380
自噬泡 380
自噬性溶酶体 377
自体吞噬 377
自养生物 304
自由基理论 595
自主复制序列 478
自装配模型 407
自组装 15,237
足迹法 243
组成型分泌途径 388
组成性异染色质 487
组蛋白 481
组织工程 587
组织特异性基因 568
组装 416
祖细胞 589

英文索引

A band 444
A site 240
absorption endocytosis 392
accelerating voltage 40
acid hydrolase 374
acrocentric chromosome 496
acrosomal process 556
acrosomal reaction 555
acrosome 380, 555
across membrane transport 345
actin filament depolymerizing protein 439
actin filament 432
actin 76
action potential 448
activation phase 605
active transport 103
actomyosin 444
adapter 400
adaptin, AP 398
address target 344
adducin 77
adenomatous polyposis colon gene, *APC* gene 617
adenylate cyclase, AC 190
adenylate kinase 267
adheren junction, zonula adheren 159
adhesion belt 159
adhesive protein 132
adipoblast 589
adrenergic receptor 196
adsorption 21
affinity chromatography 60
affinity labeling 105, 181
aflatoxin B 616
age spot 600
aminoacyl-tRNA 240
aminopterin, A 55
aminotransferase 302
amoebae 392
amoeboid movement 451
AMP response element, CRE 196
amphipathic 78
anaphase A 535
anaphase B 535
anaphase-promoting complex, APC 517
anchoring junction 159
aneuploidy 613
angstrom 7
angular aperture 31
animal pole 553
anisotropic band 444
ankyrin 77
antenna complex 320
antennapedia complex, ANT-C 584
anterior-posterior axis, A-P 580
anterograde transport 428
antibiotic 246
antimycin 288
antioxidant 599
antiport 116
antisense RNA 251
anti-apoptotic protein 620
apolipoprotein B, apoB 259
apolipoprotein B-100, apoB-100 394
apoptosis 602
apoptotic body 604
apoptotic protease-activating factor, Apaf 609
apotransferrin 396
aquaporin 112
Arabidopsis thaliana 578
archaebacteria 15
artificial chromosome 481
assembly reaction factor, ARF 401
assembly 416
astrocytoma 617
atomic force microscope, AFM 46
ATP synthase 290

ATP-binding cassettle transporter 116
atrial natriuretic factor, ANF 209
attachment protein 85
autocrine signaling 171
autolysis 380
autolysosome 377
autonomously replicating sequence, ARS 478
autophagic vacuole 380
autophagy 377
autophosphorylation 212
autoradiography 38
autotroph 304
axonal transport 428
axoneme 430
axonplasm 426
bacteria 16
bacteriorhodopsin 120
Balbiani ring, BR 469
band 3 protein 76
band 4.1 protein 77
banding pattern 498
Barr body 488
basal body 416, 431
basal lamina, basement membrane 144
basket 463
beads on a string 489
begign tumor 617
bilayer 80
bindin 556
binding-change model 293
binocular microscope 34
biogenesis 233
biomembrane system 19
biomembrane, biological membrane 70
biomolecule 8
biosynthetic pathway 341
bithorax complex, BX-C 584
bithorax mutant 574
bivalent 542
blastopore 560
blue-green algae 16
brake 618
brefeldin A 370
bundle sheath cell 332
buoyant density centrifugation 59
burst forming unit, BFU 589
cadherin 151
callus, culli 53, 567
calmodulin, CaM 205
Calvin cycle 329
cancer-promoting oncogene 619
capacitation 556
capping protein 436
capping 98
capsule 131
carbonic anhydrase 73
carbon-fixation reaction 315
carboxypeptidase 390
carcinoma 611
cardiolipin 266
carotenoid 317
carrier protein 111
cascade 184
cassette mechanism 570
catalase, CAT 301, 599
catalytic domain 209
catalytic receptor 177
catenin 154
Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase 206
Cdc protein 521
Cdc13 protein 522
Cdc2-activating kinase, CAK 522
CDK inhibitor protein 602
cell adhesion molecule, CAM 153
cell adhesion 148
cell biology 1
cell coat 124
cell communication 167
cell crawling 451
cell culture 51
cell cycle 508
cell determination 561
cell division 531
cell engineering 51
cell envelope 130
cell fusion 54
cell junction 156
cell linage 584
cell line 53
cell membrane 70

cell nucleus 461
cell recognition 148
cell secretion 387
cell signaling 168
cell sociology 27
cell sorting 49
cell strain 53
cell surface 124
cell theory 2
cell 1
cellular aging, cell senescence 591
cellular drinking 392
cellular eating 392
cellular oncogene, c-onc 619
cellular transport 103
cellularization 584
cellulose 126
cell-cycle control protein 620
cell-division cycle, cdc 513
central transporter 463
centriole 416
centromere 495
centromeric sequence, CEN sequence 479
centrosome cycle 535
centrosome 417
ceramide 79
CF_0-CF_1 ATPase complex 326
cGMP dependent protein kinase G, PKG 208
channel protein 109
channel-forming ionophore 105
check point 527
chemiosmotic coupling hypothesis 292
chiasma 542
Chinese hamster ovary cell, CHO 370
chlorophyll 316
chloroplast membrane 306
chloroplast 304
cholera toxin 196
cholera 196
cholesterol 79
chondroblast 589
chondroitin sulfate 134
chorion 580
chromatin 477
chromatography 59
chromomere 499
chromoplast 305
chromosome banding 498
chromosome sorting 50
chromosome 477
chymotrypsin 442
ciliary dynein 431
cillum 429
cis-acting element 486
cis Golgi network, CGN 367
cisternal surface 350
clathrin 400
clathrin-coated pit 401
clathrin-coated vesicle 398
cleavage 560
coat protein II, COPII 398
coatomer 398
coenzyme Q 283
colchicine 421
collagen fiber 139
collagen fibrill 139
collagen 136
colon cancer 617
colony-forming unit, CFU 589
communicating junction 157
compartment 339
complex I 287
complex II 287
compound microscope 34
condensation stage 541
condenser lens 40
condenser 34
condensin 531
condensing vesicle 366
conditional mutant 513
connexin 164
constitutive heterochromatin 487
constitutive secretory pathway 388
contact inhibition 53, 612
contact site 271
continuous cell line 53
contractile ring 534
convergence 223
COP I coated vesicle 398
COPII coated vesicle 398

core protein 134
cortical granule 553
cortical reaction 555
cortical region 451
cosmic ray 616
cotransport 119
coupling factor 1 289
coupling transport 116
co-translational translocation 270
crassulacean acid metabolism, CAM 332
cristae 264
critical concentration, Cc 420
cross bridge 447, 537
crosstalk 225
cross-linking agent 181
cross-linking protein 439
cyanobacteria 15
cyclic electron transfer pathway 324
cyclic GMP-dependent protein kinase G, G-kinase 208
cyclic photophosphorylation 328
cyclin B 517
cyclin 517
cyclin-dependent kinase, CDK 516
cyclin-kinase inhibitor, CKI 529
cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, CFTR 65
cytochalasin B 437
cytochemistry 3, 47
cytochrome c oxidase 287
cytochrome 283
cytogenetics 3
cytokine 27
cytokinesis 534
cytophysiology 3
cytoplasm 4
cytoplasmic determinant 562
cytoplasmic dynein 427
cytoplasmic membrane system 339
cytoplasmic membrane 70
cytoplasmic plaque 159
cytoplasmic ring 463
cytoplasmic streamting, cyclosis 451
cytoskeleton system 19
cytosol 340
cytosolic surface 350
C-banding 498
dark field microscope 36
dark reaction 328
deaminoacyl-tRNA 240
death domain 609
death receptor 608
death signal 605
dedifferentiation 567
dense fibrillar component, DFC 501
density-dependent inhibition of growth 612
dermatan sulfate 134
desmocollin 161
desmoglein 161
desmoplakin 161
desmosome 160
desmotubule 165
destruction box 517
detergent 87
determinant 85
detoxification 354
detyrosinase 421
diacylglycerol, DAG 185
diakinesis 542
dicarboxylate exchange carrier 308
difference spectrum 285
differential centrifugation 57
differential gene expression 569
differentiation 550
diffusion 106
digitonin 265
dinitroaniline 422
diploid sporophyte 540
diplotene stage 542
disassembly 416
divergence 224
di-acidic sorting signal 404
DNA methylation 570
DNA rearrangement 570
DNA synthesis phase 510
DNA-repair protein 620
docking protein, DP 358
dolichol phosphate 364
domain 14
dorsal-ventral axis, D-V 580
doublet 416
down regulation 192

dynamic instability 422
dynamin 400
dynein 425
D-galactose 83
D-glucose 83
D-mannose 83
early cell plate 534
early endosome 385
ectoderm 560
ectoplasm 451
editosome 259
effector 189
egg shell 580
elastic fiber 142
elastin 142
electrical coupling 164
electrochemical gradient 288
electrogenesis 288
electromagnetic lens 40
electron carrier 282
electron gun 40
electron microscope 39
electroporation 66
elementary particle 266
elongation 242, 418
embedding 37
embryoid body, EB 587
embryonic germ cell, EG cell 586
embryonic induction 563
embryonic stem cell, ES 66
emission 616
end blocking protein 439
endocrine signaling 170
endocytosis pathway 342
endocytosis 120, 377
endoderm 560
endodermal stem cell 588
endomembrane system 340
endomitosis 499
endoplasmic reticulum, ER 348
endosome 385
endosymbiont hypothesis 298
entactin 144
envelope 307
enzymatic assembly 15
enzyme cytochemistry 47
enzyme-linked receptor 174
epidermal growth factor, EGF 211
epinephrine 196
epithelia 560
ER retention signal 369
error catastrophe theory 595
erythrocyte membrane cytoskeleton 75
etioplast 305
eubacteria 15
eucaryotic cell 17
euchromatin 487
eukaryotic initiation factor 2, eIF2 576
exchangeable site, 415
execution phase 605
executioner 607
exit site 240
exited state 315
exocytosis 120, 387
exon 253
experimental cytology 3
exportin 467
extensin 128
extension 452
extracellular matrix, ECM 132
extracellular signal regulated kinase, ERK 202
facilitated diffusion 108
facultative heterochromatin 487
fat cell 353
fatty-acyl CoA 404
feeder cell 586
feeder layer 586
female gamete 551
ferredoxin 320
ferrotransferrin 396
fertillization 555
fibernetwork 136
fibrillar center, FC 501
fibrinogen 148
fibroblast growth factor, FGF 211
fibroblast 133, 589
fibronectin receptor 146
fibronectin, FN 142
fibros actin 433
filament 412

filament-severing protein 439
filamin 449
fimbrin 450
finite cell line 53
first messenger 185
flagellum 429
flavoprotein 280
flexion 97
flippase 97, 353
flip-flop 97
flow cytometer, FCM 49
fluid mosaic model 91
fluidity 96
fluid-phase endocytosis 392
fluorescence microscope 34
fluorescence recovery after photobleaching, FRAP 99
fluorescin 98
focal adhesion kinase, FAK 147
focal adhesion 159
focal length 31
follicular cell 552
footprinting 243
forming face 367
framework 412, 504
free radical theory 595
free ribosome 269
freeze-etching 44
freeze-fracture replication 44
fruit fly 578
fumarate 308
furin 390
fusion pore 391
fusion protein 391
F-type pump 115
galactose oxidase 95
galactosyltransferase 390
gametic meiosis 539
gametogenesis 551
gametophyte 540
gap gene 582
gap junction 163
gastrula 560
gated channel 109
gel filtration chromatography 60
gelsolin 222, 446, 608
gel-sol 451
gene amplification 233
gene cloning 62
gene engineering 61
gene knockout 64
gene manipulation 61
gene regulatory protein 484
genetic expression system 19
genetic program theory 595
genome 477
genomic control 570
germ cell 26
ghost 73
giant chromosome 499
Giemsa-banding 498
globular actin 433
glucocorticoid receptor, GR 477, 493
glucocorticoid 174
gluconeogenesis 196
glucose carrier 309
glucose-polymerizing enzyme 201
glycerol-phosphate shuttle 281
glycocalyx 84, 124
glycogen storage disease type II 387
glycolipid 79
glycolysis 277
glycophorin A 76
glycoprotein 128, 364
glycosaminoglycan, GAG 134
glycosyl-phophatidyl ionositol, GPI 86
glyoxysome 299
gramicidin A 105
Gram-negative 130
Gram-positive 130
granular component, GC 501
granum thylakoid 310
granum 310
groove 445
ground state 315
ground substance 134
group I intron 257
group II intron 257
growth factor receptor-bound protein 2 217
growth factor 170
growth 550

growth-factor receptor 620
GTP binding protein 186
GTPase-activating protein, GAP 187
guanine nucleotide-dissociation inhibitor, GDI 187
guanine nucleotide-exchange factor, GEF 187
guanine-nucleotide-releasing protein, GNRP 402
guanylate cyclase, GC 209
guard cell 206
guide RNA, gRNA 259
GU-AG rule 256
G-protein cycle 186
G-protein linked receptor 174
half life 249
heat shock response 476
heavy meromyosin, HMM 442
heavy-chain binding protein 363
helix-loop-helix motif 485
helix-turn-helix motif 484
hemagglutinin-estemse, HE 22
hematopoietic stem cell, HSC 588
hemicellulose 126
hemidesmosome 160
heparan sulfate 134
heparin 134
hepatocyte growth factor, HGF 211
hepatocyte 133
heterochromatin 487
heterogeneous 373
heterokaryon 54
heterologous desensitization 226
heterolysosome 377
heterophagy 377
heteropythosis 487
heterotrimeric G-protein 186
heterotroph 304
high oltage electron microscopy, HVEM 42
high-mannose oligosaccharide 371
high-mobility group protein, HMG protein 483
histological engineering 587
histone 481
homeobox 574
homeodomain 574
homeoprotein 574
homeotic gene 571
homologous chromosome 542
homologous desensitization 226
hormone 169
house-keeping gene 568
human fibroblast 592
Human Genome Project, HGP 62
hyaluronic acid 134
hydroxylation 365
hyperpolarization 210
hypertonic 107
hypoosmotic 107
hypoxanthine, H 55
I band 444
imaginal discs 579
immunocytochemistry 48
immunoelectron microscope 48
immunofluorescence 48
immunoglobulin superfamily, IgSF 155
importin 467
inclusion body 473
individual development 550
induction synchrony 512
initial meiosis 540
initiation factor, IF 241
initiation 241
initiator 607
inner cell mass, ICM 66, 586
inner membrane 264
inner nuclear membrane 462
inosositol trisphosphate, IP_3 185
insulin receptor substrate, IRS 212
insulin receptor 212
insulin 211
insulin-like growth factor1, IGF1 211
integral protein 85
integrin 145
interference 35
interkinesis 543
intermediate filament, IF 454
intermediate filament-associated protein, IFAP 456
intermediate lens 40
intermediate meiosis 540
intermembrane space 264
intermembrane-space-targeting sequence 272
internal membrane 70
internal signal sequence 362

interphase 509
intracellular receptor 172
intracellular transport 103
intramolecular chaperone 473
intrinsic protein 85
intron 253
inverted repeat, IR 334
inward transport 428
ion channel 109
ionophore 105
ion-carrying ionophore 105
ion-channel linked receptor 174
ion-exchange chromatography 61
iron-response element, IRE 576
iron-sulfur center 283
iron-sulfur protein, Fe/S protein 283
isodensity centrifugation 57
iso-osmotic 107
I-cell disease 385
karyotype 497
keratan sulfate 134
kinesin 425
kinesinlike protein 426
kinetochore 496
kinetoplast 258
knockout mice 64
lamella structure model 90
lamellipodia 452
lamina 462
laminin, LN 143
lampbrush chromosome 499
large single-copy region, LSC 334
lariat 257
larva 579
late endosome 385
lateral diffusion 96
leading peptide 271
lectin 84, 152
leptotene stage 541
leucine zipper motif 484
leukemia 611
lever arm 447
life cycle 578
ligand binding domain 209
ligand 110, 172, 392
ligand-gated channel 110
light meromyosin, LMM 442
light microscope 29
light-absorbing pigment 316
light-harvesting complex, LHC 317
light-harvesting pigment 316
lignin 126
limb bud 564
limit resolution 33
linker DNA 488
lipid bilayer 74
lipid-anchored protein 86
lipid-linked protein 86
lipid-soluble messenger 169
liposome 82
lipovitellin 552
liquidlike state 101
lobe 434
local mediator 170
low density lipoprotein, LDL 394
luxury gene 568
lymphokine 170
lymphoma 611
lysosomal storage disease 385
lysosome 373
L-fucose 83
M phase 509
M6P receptor protein 382
macrophage colony stimulating factor, M-CSF 211
macrophage 378
maculae adheren 161
magnification 33
major groove 46
malate 308
malate-aspartate shuttle 281
male gamete 551
male pronucleus 557
malignant cell 612
mannose 6-phosphate, M6P 381
masked mRNA 576
maternal gene 580
maternal information 558
matrix 264
matrix-associated region, MAR 27, 505
matrix-targeting sequence 272

maturation promoting factor, MPF 511
maturation 21
mechanochemival enzyme 441
mechanosensitive-gated channel 109
megamitochondria 262
meiotic division, meiosis 531
membrane asymmetry 93
membrane carbohydrate 82
membrane lipid 78
membrane protein 22, 85
membrane reconstitution 105
membrane traffic 339
membrane transport protein 104
membrane 70
membrane-binding protein 440
membrane-bound compartment 339
membrane-bound form of guanylate cyclase, mGC 209
membrane-bound machinery 188, 189
membrane-bound organelle 339
membrane-bound ribosome 269
mesenchyme cell 560
mesenhymal stem cell 588
mesoderm 560
mesophyll cell 332
mesosome 16
metabolic coupling 164
metacentric chromosome 496
metal-binding protein 312
metamerism 578
metamorphosis 578
metaphase 533
metastasis 614
methotrexate 276
microbody 299
microfilament 432
micromanipulation 55
microscopic structure 33
microsome 348
microspectrophotometry 48
microtubule organizing center, MTOC 417
microtubule, MT 415
microtubule-associated protein, MAP 423
microvilli 433, 450
middle lamella 129
minor groove 46
minus end 417
mitochondria 261
mitochondrial damage theory 595
mitochondrial matrix protein 271
mitogen 520
mitogen-activated protein kinase, MAPK 202
mitotic apparatus 534
mitotic division, mitosis 531
mitotic phase 509
mixed-function oxidase 354
mobility 96
molecular biology 3
molecular cell biology 4
molecular chaperone 471
molecular motor 414
monoamine oxidase 266
monoclonal antibody 54
monolayer 612
monomeric GTP-binding protein 403
monomer-sequenstering protein 439
morphogen 564
morphogenesis 134, 550
motor protein 425
movement protein 166
moving-zone centrifugation 58
mtDNA 294
mucin 155
mucolipidosis 386
multisubunit receptor 179
murein 130
muscarinic acetylcholine receptor 187
muscle contraction 444
muscle stem cell 588
mycoplasma 7
myoblast 589
myofiber 444
myofibril 444
myosin 425
N-acetyglucosamine phosphotransferase 382
N-acetyglucosamine, GlcNAc 382
N-acetyl-D-galactosamine 83
N-acetyl-glucosamine 83
NADH dehydrogenase 287
$NADP^+$ reductase 320
Na^+/K^+ pump, Na^+/K^+-ATPase 117

N-banding 499
nebulin 446
necrosis 600
negative select marker 66
negative stainning 43
nematoe 578
N-end rule 249
nerve growth factor, NGF 211
nestin 586
N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein, NSF 405
neural cell adhesion molecule, N-CAM 150
neural crest stem cell, NCSC 589
neural stem cell, NSC 586
neuronal signaling 171
neurotransmitter 171
neutrophil 378
nexin 430
nicotinic acetylcholine receptor, nAchR 175
nitric oxide synthase 219
N-linked glycosylation 364
noncyclic electron transfer pathway 324
nonhistone 483
non-cyclic photophosphorylation 327
nuclear envelope lattice 463
nuclear envelope 462
nuclear export-signal, NES 467
nuclear localization signal, NLS 466
nuclear magnetic resonance, NMR 49
nuclear matrix 461, 503
nuclear pore complex, NPC 463
nuclear protein 466
nuclear skeleton 504
nuclear splicing 256
nuclear-transport system 467
nuclease-supersensitive site 489
nucleation 418
nucleoid 4
nucleolar associated chromatin 502
nucleolar cycle 502
nucleolar matrix 502
nucleolar organizing region, NOR 497
nucleoplamic ring 463
nucleoplasm 461
nucleoplasmin 467
nucleoskeleton 503
nucleosomal histone 481
nucleosome 488
numerical aperture 32
nurse cell 553
objective lens 40
occludin 157
oncogene 618
oocyte 552
oogenesis 551
oogonia 552
osmometer 18
osmosis 106
osteoblast 589
osteogenic stem cell 588
outer membrane 264
outer nuclear membrane 462
outward transport 428
ova, egg 551
overlap zone 536
oxaloacetate 308, 332
oxidase 300
oxidation-reduction potential, redox potential 283
oxidative phosphorylation 288
oxygen-release complex 322
P site 240
pachytene stage, pachynema 542
pairing stage 542
pair-rule gene 583
papain 442
paracrine signaling 170
parasegment 583
passive transport 103
patch clamp 187
patching 98
pectin 126
penetration 21
peptidoglycan 130
peptidyl transferase 243, 254
peptidyl-tRNA site 240
pericentriolar matrix 417
perinuclear space 463
peripheral protein 85
peripheral reticulum 307
permease 109
peroxisome 299

pertussis toxin 197
phagosome 377, 378
phalloidin 437
phase contrast microscope 35
phase transition 96
pheophytin 321
phosphate exchange carrier 308
phosphatidylinositol biphosphate, PIP_2 198
phosphatidylinositol signal pathway 197
phosphatidylinositol, PI 199
phosphatidylinositol-specific phospholipase C_β, PI-PLC_β 198
phosphatidylserine 605
phosphodiesterase, PDE 196
phosphoglyceraldehyde, PGAL 308
phosphoglycerate kinase 14
phosphoglycerate, PGA 329
phosphoglycolate 330
phospholipase C_β, PLC_β 198
phospholipase 96
phospholipid exchang protein, PEP 353
phospholipid translocator 353
phospholipid 78
phosphoricamide 422
phosphorylating transport 120
phosphotyrosine motif 212
phosvitin 552
photographic system 40
photolysis 322
photon 315
photophosphorylation 325
photorespiration 330
photosynthesis 314
photosynthetic electron transfer chain 319
photosystem I complex, PSI complex 322
photosystem II complex, PSII complex 320
photosythenic electron-transfer reaction 315
physiological response 180
phytol 317
pigment 316
pigmented cell 589
pinocytosis 392
pit 393
plant cell engineering 28
plant tissue culture 53
plaque 158
plaque-bearing junction 157
plasma membrane 70
plasmodesmata 163
plasmolysis 106
plastid 305
plastocyanin, PC 312
plastoquinone, PQ 320
platelet-derived growth factor, PDGF 211
pluripotent cell 561
pluripotent stem cell 585
plus end 417
polar body 553
polar granule 562
polar lobe 562
polarity 436, 578
pole cell 580
pole plasm 562
polyethylene glycol, PEG 54
polymerase chain reaction 63
polymorphism 477
polysaccharide 12
polysome, polyribosome 245
polyspermy 557
polytene chromosome 499
polyubiquitination 517
porphyrin ring 317
position effect 487
positional information 564
positive select marker 65
posterior morphogen 580
post-translational translocation 269
premature chromosome condensation, PCC 515
preprocollagen 138
preproinsulin 372
pre-peptide 357
pre-protein 357
primarily sorting station 367
primary active transport 119
primary cell wall 129
primary constriction 495
primary culture 52
primary electron receptor 319
primary embryonic induction 563
primary fixation 37
primary lysosome 377

primordial germ cell 551
primosome 15
proalbumin 390
procollagen 139
proemzyme 384
profilin 222
progenitor cell 589
programmed cell death, PCD 602
proinsulin 372
projector lens 40
prokaryotic cell 15
proliferating cell nuclear antigen, PCNA 528
proliferation phase 551
prometaphase 533
pronuclei fussion 555
proopiomelanocortin, POMC 578
prophase 532
proplastid 305
proprotein 390
prostaglandin, PG 170
proteasome 249
protein kinase A system 188
protein kinase C system 198
protein kinase C, PKC 198
protein sorting 270
protein targeting 270
protein trafficking 270
protein translocating channel 359
proteoglycan, PG 134
protofilament 415, 456
proton-motive force 288
protoplasm 2
protoplast 3
proto-oncogene 619
pseudogene 236
pseudopodia 451
pseudouridine 235
puff 469
pulse-chase experiment 347
pump 104
pupation 579
puromycin 247
pyruvate dehydrogenase 277
P-type pump 115
quinacrine 498
Q-banding 498
radial spoke 430
radioactive labeling procedure 95
Ran nucleotide-exchange factor 1, RCC1 469
random repeat 334
Ras protein 215
reaction-center complex 317
receptor crossover 179
receptor down-regulation 226
receptor tyrosine kinase, RTK 177, 178, 210
receptor with intrinsic enzymatic activity 177
receptor 172
receptor-mediated endocytosis 392
recognition helix 484
recombinant DNA 61
recombination nodule 542
recombination stage 542
recondensation stage 542
red blood cell, erythrocyte 72
redifferentiation 567
redox pair 283
regeneration 568
regulated secretory pathway 389
release factor, RF 244
release 21
repetitive sequence 478
replication 21
resact 555
resolution 32
respiratory chain 281
restriction point 520
retinal stem cell 588
retinoblastoma protein, RB protein 601
retrograde transport 428
reverse-banding 499
reversibility 180
ribitol 131
ribonuclease P 254
ribosomal protein 231
ribosome recombination 238
ribosome 229
ribozyme 24
ribulose bisphosphate carboxylase 329
ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase-oxygenase, rubisco 311
RNA editing 258

RNA splicing 256
rolling circle replication 234
rotation 97
rough endoplasmic reticulum, RER 349
Rous sarcoma virus, RSV 619
S phase-promoting factor, SPF 524
saccule 366
sarcolemma 444
sarcoma 611
sarcomere 444
sarcoplasmic reticulum, SR 448
satellite 497
saturation 180
scaffold 412
scaffold-associated region, SAR 505
scanning electron microscope, SEM 40
scanning transmission electron microscope, STEM 41
scanning tunneling microscope, STM 45
second messenger 185
secondary active transport 119
secondary cell wall 129
secondary constriction 497
secondary lysosome 377
secretory pathway 342
segment 583
segmentation gene 582
segment-polarity gene 583
selectin 154
selection synchrony 512
selector gene 583
self-assembly 15, 237
self-splicing 254
semiautonomous organell 333
semipermeability 70
semipermeable 107
senescence gene 595
senescence-associated gene 595
senescing, aging 591
sertoli cell 553
serum albumin 390
SH domain 212
shadow casting 43
sheet 420
shock 387
shrink 107
shuttling receptor 467
sialic acid 83
sialyltransferase 390
signal hypothesis 357
signal molecule 169
signal patch 382
signal peptidase 359
signal peptide 271
signal recognition partical, SRP 358
signal sequence 271, 356
signal transduction protein 620
signal transduction 168, 182
signaling cascade 184
signaling complex 211
signaling protein 211
signaling via enzyme-linked receptor 208
silicosis 386
simple diffusion 107
singlet 416
single-particle tracking, SPT 100
single-pass receptor 179
skeletal muscle 444
sliding filament model 447
sliding-microtubule model 431
small cytoplasmic RNA 250
small GTP binding protein 405
small nuclear RNA 250
small single-copy region, SSC 334
smooth endoplasmic reticulum, SER 349
solenoid 493
soluble NSF attachment protein, SNAP 405
sol-gel 451
somatic cell 26
somatic mutation theory 595
somatic stem cell 585
sorting out 150
spacer 253
specialization 561
specificity 179
spectrin 76
sperm cell 540
sperm 551
spermatid 540
spermatocyte 554
spermatogenesis 553

spermatogonium 553
spherosome 376
sphingolipid 78
sphingosine 78
spike protein 22
spindle equator 533
spindle pole body 417
spindle 533
spliceosome 15, 256
spoke 463
spontaneous self-assembly 407
spooling model 491
sporic meiosis 540
Src homology domain 213
stacked thylakoid 310
staining 38
START 524
start-transfer signal 361
steady state 434
stem cell, SC 585
steroid hormone 170
stimulatory receptor, R_s 192
stop-transfer peptide 362
stop-transfer signal 362
stree fiber 449
stretch-gated channel 110
stroma lumen 310
stroma thylakoid 310
stroma 305
structural maintenance of chromosome, SMC 531
submetacentric chromosome 496
submicroscope structure 39
substratum 452
succinate dehydrogenase 287
succinate 308
sucrose density gradient centrifugation 58
supercoiled loop 493
superfamily 455
superoxide dismutase, SOD 599
supersolenoid 493
surface receptor 172
survival factor 608
swell 107
swinging lever arm 447
symport 116
symptom of early aging 596
synapsis 542
synaptonemal complex, SC 542
synchronization 512
syncytium 580
talin 146
targeting sequence 271
targeting signal 271
taxol 421
teichoic acid 131
telocentric chromosome 496
telomeric sequence, TEL sequence 478
telophase 533
temperature 101
template assembly 15
tenascin 144
terminal meiosis 539
terminalization 542, 545
terminal-banding 499
termination 225
thick filament 444
thin filament 444
thrombospondin 144
thylakoid lumen 310
thylakoid 307
thymine, T 55
tight junction 157
tissue-specific gene 568
titin 446
tonofilament 456
totipotency 561
totipotent stem cell, TSC 585
trans-acting factor 486
trans Golgi network, TGN 367
transcellular transport 103
transcription factor 620
transcription inhibitory complementary RNA, tic RNA 251
transcription unit 234
transcriptional activator 580
transcriptional control 571
transcriptional repressor 580
transcytosis 393, 396
transdetermination 567
transducin 209, 210
transferrin 396

transit peptidase 271
transit peptide 271
transition temperature 101
translational control 575
translational repressor 580
translocation 243
translocator 272
transmembrane protein 85
transmission electron microscope, TEM 40
transport through nuclear pore 345
transport vesicle 345, 388
transverse diffusion 97
transverse tubule 448
treadmilling 422
triplet 416
Triton X-100 414
tropocollagen 137
tropomodulin 445
tropomyosin, Tm 445
tropomyosin 76
troponin, Tn 445
trypanosome 258
tubulin 415
tumor necrosis factor, TNF 608
tumor suppressor gene 618
tyrosine kinase-linked receptor 177
ubiquitin ligase, E3 517
ubiquitin-conjugating enzyme, E2 517
ultrastructure 39
ultrathin section 42
uniport 116
unipotency 561
unipotent stem cell 585
unique sequence 478
uniquinone, UQ 283
unit membrane model 90
unstacked thylakoid 310
up regulation 192
urate oxidase 302
vacuole 376
vacuum system 40
valinomycin 105
vascularendothelial growth factor, VEGF 211
vegetal pole 553
velocity centrifugation 57
very low-density lipoprotein, VLDL 394
vesicle translocation 345
vesicular stomatitis virus, VSV 370
video microscopy 414
villi 450
vinculin 147
viral oncogene, v-onc 619
vitelline envelope 553
vitellogenin 552
voltage-gated channel 109
V-type pump 115
water-soluble messenger 169
water-splitting reaction 322
whooping couch 196
X-inactivation 488
X-ray diffraction 47
yolk platelet 552
Z disk 445
zebra fish 578
zinc finger motif 484
zona pellucida 553
zone of polarizing activity, ZPA 565
zygotene stage 542
zygotic gene 582
zygotic meiosis 540
zymogen 607
α-actinin 445
α-bungarotoxin 176
α-catenin 159
α-helical neck region 441
α-tubulin 415
β-catenin 159
β-glucocerebrosidedase 386
β-lactamase 358
β-tubulin 415
γ-aminobutgric acid receptor, GABAR 175
γ-tubulin ring complex, γ-TuRC 418

后　记

细胞生物学作为重要的专业基础课，专业名词术语与符号亟待规范统一。本书中的词汇全部以全国科学技术名词审定委员会审定的、科学出版社 2002 年 5 月出版的最新版《英汉·汉英生物学名词》为标准，进行了规范统一。另外，书中所涉及的人类、鼠类、果蝇、酵母等多种生物的基因和蛋白质的命名，均参考科学出版社 2000 年 8 月出版的《TIG 遗传命名指南》。

由于书中的英文缩写词较多，故在文后增添了缩写表，方便读者使用查阅。索引分成中文索引与英文索引两部分，读者可以从中文和英文两方面入手，查阅到书中相关内容。

本书的封面组合图选用了我们自己的一组教学科研照片。左上图是水稻开花期花序，左下图是大花飞燕草叶切段再生植株，中上图是虎纹蛙骨髓细胞核型（$2n=26$），中中图是培养的乳腺癌 MCF-7 细胞（正常、凋亡、坏死），中下图是推测的胡萝卜抗冻蛋白的作用模型，右上图是推测的胡萝卜抗冻蛋白的 β 螺旋，右下图是正在开花的重瓣大岩桐（组培苗）。

凡使用本书作为教材的主讲教师，可免费向科学出版社索取由作者提供的教学课件一份（E-mail:bio-edu@cspg.net）。另外，本书将有立体化系列《细胞生物学词典》、《细胞生物学习题解析》等陆续出版。

本书在编写过程中受国家“理科基础科学研究与教学人才培养”中山大学生物学基地建设基金资助，谨表谢意。

由于作者水平所限，书中错误在所难免，真诚希望读者提出宝贵的批评意见与修改建议。

作者

2003 年 8 月

[General Information]
书名=细胞生物学
作者=王金发编著
页数=662
出版社=科学出版社
出版日期=2003年08月第1版
SS号=11119069
DX号=000001201777
url=http://book2.duxiu.com/bookDetail.jsp?dxNumber=000001201777&d=4E647F10064819E74FA013513 15A1017&fenlei=1507&sw=%CD%F5%BD%F0%B7%A2

封面
书名
版权
前言
目录
1　细胞概述
1．1　细胞的发现及细胞学说的创立
1．1．1　细胞的发现
1．1．2　细胞学说的创立
1．1．3　细胞学理论对细胞学发展的推动作用
1．1．4　细胞生物学发展简史
1．2　细胞的共性
1．2．1　细胞结构的共性
1．2．2　细胞功能的共性
1．2．3　细胞的形态
1．2．4　细胞的大小及体积的恒定……

……（6）
1.2.5 细胞及细胞器的计量单位
1.3 细胞的分子基础
1.3.1 细胞中的水
1.3.2 无机盐
1.3.3 有机小分子
1.3.4 生物分子及其功能
1.3.5 细胞结构体系的组装
1.4 细胞的类型和结构体系
1.4.1 原核细胞
1.4.2 真核细胞的两种主要类型：动物细胞和植物细胞
1.4.3 真核细胞的结构体系
1.4.4 真

核细胞与原核细胞的比较
1．5 病毒——非细胞的生命体
1．5．1 病毒是比细胞更小的生命体
1．5．2 病毒只能在细胞中增殖
1．5．3 冠状病毒与SARS
1．6 细胞生命的进化
1．6．1 细胞生命的起源
1．6．2 真核细胞的起源
1．6．3 从单细胞向多细胞进化
1．7 我国细胞生物学的发展战略
1．7．1 细胞生物学的主要研究内容和发展方向
1．7．2 我国细胞生物学发展战略
提要
2 细胞生物学研究方法
2．1 显微成像技术

2．1．1　光学和电子显微镜成像原理
2．1．2　常用的光学显微镜
2．1．3　光学显微镜的样品制备
2．1．4　电子显微镜
2．1．5　电子显微镜的样品制备
2．1．6　间接成像技术
2．2　细胞化学技术
2．2．1　酶细胞化学技术
2．2．2　免疫细胞化学技术
2．2．3　其他细胞化学技术
2．3　细胞分选技术……（49）
2．3．1　流式细胞仪的基本结构……（49）2

．３．２　细胞分选
２．３．３　染色体分选
２．４　细胞工程技术
２．４．１　细胞培养
２．４．２　细胞融合与单克隆抗体技术
２．４．３　动物细胞核移植克隆技术
２．５　分离技术
２．５．１　离心分离技术
２．５．２　层析分离技术
２．６　分子生物学方法
２．６．１　基因工程技术
２．６．２　基因作图与人类基因组计划
２．６．３　ＰＣＲ技术
２．６．４　选择性基因剔除与转基因鼠
２．６．５　乳

腺生物反应器技术
提要
3 细胞质膜与跨膜运输
3．1 概述
3．1．1 细胞的膜结构
3．1．2 细胞膜的功能
3．2 红细胞膜结构
3．2．1 红细胞的生物学
3．2．2 红细胞膜结构的研究
3．2．3 红细胞质膜
3．3 膜的化学组成
3．3．1 膜脂
3．3．2 膜糖
3．3．3 膜蛋白
3．4 膜的分子结构及特点
3．4．1 结

构模型
3．4．2　膜不对称性
3．4．3　膜的流动性
3．5　物质的跨膜运输
3．5．1　质膜物质运输概述
3．5．2　被动运输
3．5．3　主动运输
3．5．4　主动与被动运输、动物与植物主动运输的比较
提要
4　细胞环境与互作
4．1　细胞表面
4．1．1　细胞被
4．1．2　植物的细胞外结构：细胞壁
4．1．3　细菌的细胞细胞壁
4．2　细胞外基质

4．2．1　细胞外基质的基本组成和功能
4．2．2　蛋白聚糖与透明质酸
4．2．3　胶原和弹性蛋白
4．2．4　细胞外基质中的黏着蛋白
4．2．5　细胞外基质与细胞的相互关系
4．3　细胞识别与黏着
4．3．1　细胞识别及识别反应
4．3．2　细胞黏着的机制
4．4　细胞连接
4．4．1　细胞连接的概念和类型
4．4．2　紧密连接
4．4．3　斑块连接
4．4．4　通讯连接
提要

5　细胞通讯
5．1　细胞通讯的基本特点
5．1．1　细胞通讯的方式
5．1．2　信号分子及信号传导
5．1．3　受体与信号的接收
5．1．4　受体与配体相互作用及研究方法
5．1．5　信号转导与第二信使
5．2　G蛋白偶联受体及信号转导
5．2．1　G蛋白的结构与功能
5．2．2　PKA系统的信号转导机制
5．2．3　PKC系统的信号转导机制
5．3　酶联受体信号转导
5．3．1　鸟苷酸环化酶受体与第二信使cGMP

５．３．２　受体酪氨酸激酶／Ｒａｓ途径
５．４　其他信号转导途径
５．４．１　ＮＯ的细胞信使作用
５．４．２　整联蛋白介导的信号转导
５．５　信号的整合与终止
５．５．１　信号的趋同、趋异与窜扰
５．５．２　信号终止
提要
６　核糖体与核酶
６．１　核糖体的形态结构
６．１．１　核糖体的类型和化学组成
６．１．２　核糖体蛋白质与ｒＲＮＡ
６．１．３　细菌核糖体的结构模型
６．２　核糖体的生物发

生……（２３３）
６．２．１　核糖体ｒＲＮＡ基因的转录与加工……（２３３）
６．２．２　核糖体的装配
６．３　核糖体的功能——蛋白质的合成
６．３．１　核糖体的功能位点
６．３．２　蛋白质合成的基本过程
６．３．３　多聚核糖体
６．３．４　蛋白质合成抑制剂
６．３．５　细胞中蛋白质的寿命与降解
６．４　反义ＲＮＡ与核酶
６．４．１　小分子ＲＮＡ与反义ＲＮＡ
６．４．２　核

酶
6．4．3　内含子的切除：核酶的作用机制
6．4．4　RNA编辑
提要
7　线粒体与过氧化物酶体
7．1　线粒体的形态结构
7．1．1　线粒体的发现与功能研究
7．1．2　线粒体的形态与分布
7．2　线粒体的结构与化学组成
7．2．1　线粒体的结构
7．2．2　线粒体膜的通透性
7．2．3　线粒体各部分的化学组成和特性
7．2．4　线粒体内膜的主动运输系统
7．3　导向信号与线粒体蛋白定位

7．3．1　蛋白质寻靶与分选
7．3．2　线粒体蛋白转运
7．3．3　线粒体蛋白转运的实验研究
7．4　线粒体的功能——氧化磷酸化作用
7．4．1　真核细胞中的氧化作用
7．4．2　呼吸链与电子传递
7．4．3　氧化磷酸化：ATP形成机制
7．5　线粒体的遗传、增殖和起源
7．5．1　线粒体遗传
7．5．2　线粒体的增殖与起源
7．6　过氧化物酶体
7．6．1　过氧化物酶体的发现及所含酶类
7．6．2　过氧化物酶体的功能

7．6．3　过氧化物酶体的生物发生
提要
8　叶绿体与光合作用
8．1　叶绿体的来源与分布
8．1．1　叶绿体与质体
8．1．2　叶绿体的形态大小、数量和分布
8．2　叶绿体的结构与化学组成
8．2．1　叶绿体被膜的结构及特性
8．2．2　类囊体
8．2．3　叶绿体蛋白的定位
8．2．4　叶绿体组分的分离
8．3　光合作用的光反应
8．3．1　光合作用概述
8．3．2　光

吸收
8．3．3　电子传递
8．3．4　光合磷酸化
8．4　光合作用的暗反应
8．4．1　C 3 途径：卡尔文循环
8．4．2　光呼吸和C 4 植物
8．5　叶绿体遗传
8．5．1　叶绿体遗传
8．5．2　叶绿体的发生和起源
8．5．3　叶绿体与线粒体结构与功能的比较
提要
9　内膜系统与蛋白质分选和膜运输
9．1　细胞质膜系统及其研究方法
9．1．1　膜结合细胞器与内膜系统

9．1．2　内膜系统与蛋白质分选
9．1．3　内膜系统的研究方法
9．2　内质网
9．2．1　形态结构和化学组成
9．2．2　光面内质网的功能
9．2．3　糙面内质网的功能——蛋白质转运
9．3　高尔基体
9．3．1　高尔基体的形态结构和极性
9．3．2　高尔基体的功能
9．4　溶酶体
9．4．1　溶酶体的形态结构
9．4．2　溶酶体的发现与溶酶体的酶类
9．4．3　溶酶体的类型
9．4．4　溶酶体的功能

９．４．５　溶酶体的生物发生
９．５　细胞的分泌与内吞作用
９．５．１　细胞分泌
９．５．２　吞噬作用与内吞作用
９．６　小泡运输的分子机制
９．６．１　运输小泡的类型和分选信号
９．６．２　披网格蛋白小泡形成的机制
９．６．３　ＣＯＰ被膜小泡形成的机制
９．６．４　小泡的定向运输、停靠和融合机制
９．６．５　膜的生物发生
提要
１０　细胞骨架与细胞运动
１０．１　细胞骨架的组成和功能
１０．１．１

细胞骨架的组成和分布
10.1.2 细胞骨架的功能
10.1.3 细胞骨架的研究方法
10.2 微管
10.2.1 微管的结构和类型
10.2.2 微管装配的动力学
10.2.3 微管结合蛋白
10.2.4 分子发动机
10.2.5 微管的功能
10.3 微丝
10.3.1 微丝的形态和组成
10.3.2 微丝装配的动力学
10.3.3 微丝结合蛋白
10.3.4 肌细胞：特化的肌收缩功能

10.3.5 肌动蛋白和肌球蛋白在非肌细胞中的作用
10.4 中间纤维
10.4.1 中间纤维的结构与类型
10.4.2 中间纤维的组装及去组装
10.4.3 中间纤维的功能
10.4.4 三种细胞骨架的比较
提要
11 细胞核与染色体
11.1 核被膜
11.1.1 核被膜的结构
11.1.2 核孔复合物
11.1.3 核被膜的功能
11.2 核孔复合体的运输作用
11.2.1 核孔运输的一般特点

11.2.2
核孔运输的信号引导
11.2.3
核蛋白、核定位信号、输入蛋白、输出蛋白
11.2.4
核运输系统
11.3 分子伴侣
11.3.1
分子伴侣的发现及种类
11.3.2
分子伴侣的功能和作用机制
11.4 染色质
11.4.1
染色质DNA
11.4.2
组蛋白
11.4.3
非组蛋白
11.4.4
异染色质和常染色质
11.4.5
染色质的基本结构——核小体
11.5 染色体
11.5.1

染色体的包装
11.5.2 中期染色体结构
11.5.3 核型与染色体分带
11.5.4 巨型染色体
11.6 核仁
11.6.1 核仁的结构与核仁周期
11.6.2 核仁的功能
11.7 核基质
11.7.1 核基质的化学组成
11.7.2 核基质的功能
提要
12 细胞周期与细胞分裂
12.1 细胞周期
12.1.1 细胞周期时相及类型
12.1.2 细胞周期各时相的合成活动
12.1.3

细胞周期中细胞形态结构的变化
12.1.4
细胞周期的研究方法
12.2 细胞周期调控
12.2.1
细胞周期调控概述
12.2.2
蛋白激酶在细胞周期调控中的作用
12.2.3
裂殖酵母的细胞周期调控
12.2.4
芽殖酵母的细胞周期调控
12.2.5
哺乳动物细胞周期的控制
12.2.6
细胞周期的关卡
12.2.7
MPF的作用机制
12.3 有丝分裂
12.3.1
有丝分裂过程
12.3.2
有丝分裂的机制
12.4 减数分裂
12.4.1

减数分裂的一般特点
12.4.2
减数分裂的主要类型
12.4.3
第一次减数分裂
12.4.4
第二次减数分裂
12.4.5
减数分裂过程中的遗传重组及其机制
12.4.6
减数分裂的生物学意义
提要
13 胚胎发育与细胞分化
13.1 配子发生与受精作用
13.1.1
配子发生
13.1.2
受精作用
13.2 胚胎形成与分化
13.2.1
胚胎形成
13.2.2
细胞分化、细胞决定与形态发生

13.2.3 影响分化和形态发生的其他因素
13.2.4 细胞分化中的核质关系
13.2.5 转决定、脱分化与再生
13.3 细胞分化的分子基础
13.3.1 分化细胞的基因表达
13.3.2 真核生物基因表达的调控
13.3.3 果蝇发育的调控
13.4 干细胞
13.4.1 干细胞分类和特点
13.4.2 胚胎干细胞
13.4.3 成体干细胞
提要
14 细胞衰老、死亡与癌变
14.1 细胞衰老
14.1.1

衰老的概念
14.1.2
细胞的寿限
14.1.3
细胞衰老的特征
14.1.4
细胞衰老的理论
14.2 细胞死亡
14.2.1
多细胞有机体中细胞数量和质量的控制
14.2.2
程序性细胞死亡及其特性
14.2.3
程序性细胞死亡的机理
14.2.4
程序性细胞死亡的生物学意义
14.3 癌细胞
14.3.1
癌生物学
14.3.2
癌的起因：物理和化学致癌物
14.3.3
肿瘤发生遗传学
提要

参考文献
缩写表
中文索引
英文索引
后记